

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA



INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS  
DE CASTILLA Y LEÓN



TESIS DOCTORAL

Caracterización *in vivo* e *in vitro* de progenitores  
neurales en la retina de peces teleósteos

M. Rosario Sánchez González

2009

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
CELULAR Y PATOLOGÍA**



**INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS  
DE CASTILLA Y LEÓN  
LAB. NEUROBIOLOGÍA COMPARADA**



**Caracterización *in vivo* e *in vitro* de progenitores  
neurales en la retina de peces teleósteos**

Salamanca, 2009

Fdo.: M. Rosario Sánchez González

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
CELULAR Y PATOLOGÍA**

**INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS  
DE CASTILLA Y LEÓN  
LAB. NEUROBIOLOGÍA COMPARADA**



Trabajo realizado por  
M. Rosario Sánchez González  
para aspirar al grado de  
Doctor en Biología

Salamanca, 2009

Los Directores:

Fdo.: M. R. Arévalo Arévalo

Fdo.: A. F. Porteros Herrero

José Aijón Noguera, Catedrático de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca, Director del Departamento de Biología Celular y Patología

INFORMA:

Que el presente trabajo titulado **“Caracterización *in vivo* e *in vitro* de progenitores neurales en la retina de peces teleósteos”**, ha sido realizado en el Departamento de Biología Celular y Patología, bajo la dirección de los Profesores Rosario Arévalo Arévalo y Ángel Fernando Porteros Herrero, y considero que reúne las condiciones necesarias para ser defendido en nuestra Universidad y optar al Grado de Doctor.

Salamanca, 2009

Rosario Arévalo Arévalo y Ángel Fernando Porteros Herrero, Profesores  
Titulares de Biología Celular de la Universidad de Salamanca,

INFORMAN:

Que el trabajo titulado “**Caracterización *in vivo* e *in vitro* de progenitores neurales en la retina de peces teleósteos**”, realizado por Dña. M. Rosario Sánchez González en el Departamento de Biología Celular y Patología de la Universidad de Salamanca bajo nuestra dirección, reúne todos los requisitos formales y científicos para ser defendido como Tesis Doctoral en la Universidad de Salamanca.

Salamanca, 2009

A mis padres

A Adrián

# Agradecimientos

Durante la realización de esta Tesis Doctoral he tenido la suerte de conocer y de trabajar con gente increíble. A todos ellos quiero transmitirles todo mi afecto y mi más profundo agradecimiento.

Al **Prof. Dr. J. Aijón** por permitirme formar parte de este gran grupo, por confiar en mí y apoyarme en todo momento. Después de estos cinco años espero haberle demostrado que los gaditanos sí somos de fiar.

A mis directores de Tesis, **Profs. Dra. Rosario Arévalo** y **Dr. Ángel Porteros** por haberme iniciado en la investigación y por haber recorrido este largo camino conmigo. A Rosario por aguantar mis pataletas y mis enfados (que no han sido pocos) en los momentos de crisis, por confiar en mi trabajo y porque sin su ayuda y su ánimo esta Tesis sería totalmente diferente. A Ángel por sus buenos consejos, por todas esas conversaciones a puerta cerrada (son muy buenas para el alma) y sobre todo por aguantar mis parrafadas cuando estaba perdida. Muchas gracias a los dos.

A todos los profesores del área de Biología Celular por su ayuda durante todos estos años. En especial, al **Prof. Dr. Juan Lara** por su inmensa sabiduría y porque siempre ha apoyado incondicionalmente todas mis ideas (por peregrinas que fuesen!!!). A la **Prof. Dra. Almudena Velasco** y a la **Prof. Dra. Concepción Lillo** por toda su ayuda y porque siempre sacaban un ratito para solventar todas mis dudas.

A Maite, nuestra técnico y a todos mis compañeros de Biología Celular porque siempre me habéis ayudado cuando lo he necesitado. A Javier Arenzana, porque sin él los primeros años hubiese estado totalmente perdida, por su enorme generosidad al enseñarme y por el número de teléfono del albanokosovar (nunca se sabe cuando lo puedes necesitar). A Marta, por esos viernes locos (si esta Tesis tuviese banda sonora sería la Vaquita de Martín) y por todas las cervezas después del labo. A Maite, Saúl y Miguelón porque han sido un soplo de aire fresco en el laboratorio.

Al **Prof. Dr. Ludwig Aigner** por acogerme en su laboratorio en Regensburg (Alemania) y por enseñarme todo lo que sé sobre cultivos primarios. Al **Prof. Dr. Stephen Wilson** por cedernos amablemente las ribosondas utilizadas en el presente trabajo.

A todos mis amigos (Abi, Patri, Isa, Lore, Eva, Rubén, Susi, Paco, Ángel, Javi, ...seguro que me dejo a alguien!!!!) por soportarme tantos años y hacerme olvidar durante un ratito los sinsabores de la tesis. A Jorge (George) porque fue genial estar tantos años a tu derecha en el labo y porque se te echa mucho de menos. A Fátima por todos esos cafés mañaneros, sin



## *Agradecimientos*

---

ellos habría días que no hubiese sobrevivido. A Vero, por su amistad y su apoyo, sin ella el laboratorio es un poco más aburrido.

A Adrián porque esta Tesis están tuya como mía, por aguantarme y apoyarme en todo momento, y por decirme las cosas que no quería oír. Por estar siempre ahí.

A mis padres, porque ellos han sufrido esta Tesis más que yo y porque su amor incondicional me ayuda a superar cualquier cosa. A mi hermano (mi niño pequeño), por su cariño y por ser como es. Al resto de mi loca familia, por aguantar al Snorkel Nº1 y porque es genial estar con vosotros cuando vuelvo a casa.

Muchas gracias a todos.

Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Castilla y León (Grupos de Excelencia SAN673/SA/16/08), Cajas de Ahorros Confederadas de Castilla y León, Red de Terapia Celular del FIS-JCyL y la beca predoctoral para la Formación de Investigadores de la Junta de Castilla y León.

# Índice

---

# INDICE

<b>Abreviaturas.....</b>	<b>7</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>11</b>
1.1 La retina de vertebrados.....	13
1.1.1 Capas de la retina.....	13
1.1.2 Células retinianas.....	15
- Fotorreceptores.....	15
- Interneuronas.....	17
- Células de proyección.....	19
- Células gliales.....	20
1.2 Neurogénesis en retina adulta de teleósteos.....	22
1.2.1 Crecimiento continuo de la retina.....	23
- Zona periférica germinal.....	23
- Linaje de bastones.....	24
1.2.2 Progenitores en la retina de otros vertebrados.....	26
1.3 Caracterización de los progenitores en la retina adulta.....	28
- Pax6.....	30
- Islet1.....	31
- Prox1.....	31
- NeuroD.....	32
- Nestina .....	32
- Prominina1/CD133.....	33
- Notch1 .....	34
1.4 Posibles aplicaciones de los progenitores retinianos en terapia celular.....	35
<b>Justificación y Objetivos.....</b>	<b>37</b>
<b>Material y Métodos.....</b>	<b>41</b>
3.1 Animal de experimentación.....	43
3.2 Pretratamiento de los animales.....	43
3.2.1 Tratamiento antiséptico.....	43
3.2.2 Inyección de BrdU.....	44
3.3 Extracción de los ojos y la retina.....	44
3.4 Procesamiento histológico.....	45
3.5 Técnicas inmunohistoquímicas.....	45
3.5.1 Inmunohistoquímica en secciones.....	46

- Método avidina-biotina-peroxidasa.....	46
- Método inmunofluorescente.....	47
3.5.2 Controles de la técnica inmunohistoquímica.....	48
3.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) Western-Blot.....	49
3.7 Técnica de hibridación in situ.....	51
3.7.1 Controles de la hibridación <i>in situ</i> .....	53
3.8 Cultivos primarios de células progenitoras de bastón.....	53
3.8.1 Protocolo del cultivo primario.....	53
- Método de exclusión del azul tripán.....	55
- Prueba de antibióticos.....	55
- Adhesión celular al sustrato.....	55
3.9 Análisis de imagen.....	56
<b>Resultados.....</b>	<b>57</b>
4.1 Proliferación celular: Detección de BrdU.....	59
4.1.1 Protocolo de administración.....	59
4.1.2 Localización de las células proliferativas.....	60
4.2 Inmunorreactividad para marcadores neurales en la retina madura.....	63
4.2.1 Pax6.....	63
4.2.2 Islet1.....	65
4.2.3 Prox1.....	67
4.2.4 NeuroD.....	70
4.2.5 Nestina.....	73
4.2.6 CD133.....	75
4.3 Expresión de marcadores de células progenitoras.....	77
4.3.1 Notch1.....	77
4.3.2 NeuroD.....	81
4.4 Estudios <i>in vitro</i> de las células progenitoras de bastón.....	83
4.4.1 Optimización del protocolo de cultivo.....	83
- Temperatura.....	83
- pH.....	84
- CO2.....	85
- Disgregación tisular.....	85
- Medio de cultivo.....	86
- Sustratos de adhesión celular y diferenciación.....	94
<b>Discusión.....</b>	<b>95</b>

5.1 Proliferación celular en la retina adulta.....	97
5.2 Expresión de marcadores neurales en el linaje de bastón.....	99
5.2.1 Pax6.....	99
5.2.2 Islet1.....	102
5.2.3 Prox1.....	104
5.2.4 NeuroD.....	107
5.2.5 Nestina.....	111
5.2.6 CD133.....	113
5.2.7 Notch1.....	115
5.3 Implicación funcional de los marcadores estudiados en la regulación de la neurogénesis.....	120
5.4 Caracterización <i>in vitro</i> de progenitores neurales.....	122
<b>Conclusiones.....</b>	<b>129</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>133</b>

# Abreviaturas

---

<b>ABC:</b> Complejo avidina-biotina-peroxidasa	<b>MLI:</b> Membrana limitante interna
<b>AC:</b> Arteria central	<b>NBT:</b> Azul de nitrotetrazolio
<b>APS:</b> Persulfato amónico	<b>NO:</b> Nervio óptico
<b>BCIP:</b> Bromo-cloro-indol-fosfato	<b>PCNA:</b> Antígeno nuclear de células proliferativas
<b>bHLH:</b> Dominio hélice-bucle-hélice básico	<b>PDD:</b> Papaína-DNAsa-dispasa
<b>BrdU:</b> Bromodeoxiuridina	<b>PFA:</b> Paraformaldehído
<b>CCG:</b> Capa de células ganglionares	<b>RNasa:</b> Ribonucleasa
<b>CFNO:</b> Capa de las fibras del nervio óptico	<b>SDS:</b> Dodecil sulfato sódico
<b>CNE:</b> Capa nuclear externa	<b>SF:</b> Segmentos de los fotorreceptores
<b>CNI:</b> Capa nuclear interna	<b>SSC:</b> Tampón citrato sódico salino
<b>CNO:</b> Cabeza del nervio óptico	<b>SNC:</b> Sistema nervioso central
<b>CPE:</b> Capa plexiforme externa	<b>PK:</b> Proteinasa K
<b>CPI:</b> Capa plexiforme interna	<b>TEA:</b> Trietanolamina
<b>DAB:</b> Diaminobencidina	<b>TF:</b> Tampón fosfato
<b>DAPI:</b> Diamidinofenilindol	<b>TEMED:</b> Tetrametiletilendiamina
<b>DMAE:</b> Degeneración macular asociada a la edad	<b>ZMC:</b> Zona marginal ciliar
<b>DMEM:</b> Dulbecco's modified Eagle's medium	<b>ZPG:</b> Zona periférica germinal
<b>EC:</b> Epitelio ciliar	<b>ZT:</b> Zona de transición
<b>EDTA:</b> Ácido etilenodiaminotetraacético	
<b>EGF:</b> Factor de crecimiento epidérmico	
<b>EP:</b> Epitelio pigmentario	
<b>FGF:</b> Factor de crecimiento fibroblástico	
<b>H3-F:</b> Histona H3 fosforilada	
<b>HD:</b> Homeodominio	
<b>IP:</b> Ioduro de propidio	
<b>kDa:</b> Kilodalton	
<b>MC:</b> Margen ciliar	
<b>MLE:</b> Membrana limitante externa	

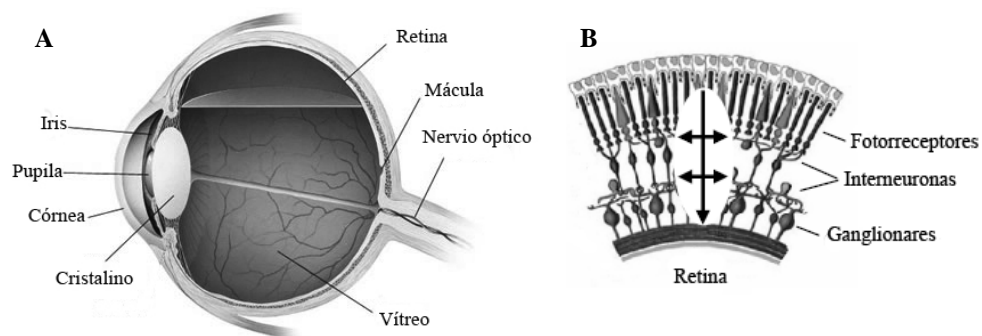
# Introducción



## 1.1 La retina de vertebrados

La retina es la capa más interna del globo ocular, encargada de la recepción y el procesamiento inicial de la información visual. Se origina a partir de una evaginación del prosencéfalo y por tanto es parte del Sistema Nervioso Central (SNC). La retina presenta una estructura laminar muy organizada, los somas neuronales se localizan en las denominadas capas nucleares, mientras que sus procesos y las conexiones entre ellos constituyen las capas plexiformes.

La información visual se genera en los fotorreceptores tras producirse la fototransducción. A partir de los fotorreceptores la información sigue una vía vertical de transmisión, pasando de las células bipolares a las ganglionares, pero antes de enviar la información visual a centros superiores sufre una modulación por parte de varios tipos de interneuronas que constituyen la vía horizontal (Fig. 1). Mientras que en la vía vertical el neurotransmisor liberado es siempre el glutamato, en la vía horizontal se establecen tanto sinapsis inhibitorias como excitadoras.



**Fig. 1:** A) Esquema del globo ocular humano. B) Ampliación de la retina donde se indican la vía vertical y las vías horizontales de la transmisión visual. Modificado de Kolb *et al.*, 2000.

### 1.1.1 Capas de la retina

La retina está formada por 8 estratos diferentes (Fig. 2) (Ramón y Cajal, 1889, 1892) que, desde la parte más escleral a la más vitreal, son:

**Epitelio pigmentario (EP):** Es la capa más escleral que se localiza entre la coroides y la retina neural, constituyendo la barrera hematorretiniana. Está formada por una monocapa de células epiteliales que contienen pigmentos y se encuentran unidas entre sí por complejos de unión. Estas células presentan en su cara apical una serie de procesos alargados que se

interdigitan con los segmentos externos de los fotorreceptores. En muchos vertebrados anamniotas, sobre todo en peces y anfibios, estos procesos llegan hasta la membrana limitante externa y se interdigitan con microvellosidades de las células de Müller (Wagner, 1990; Marc, 1998).

El EP realiza diferentes funciones, entre ellas regular la concentración de iones y agua en el espacio subretinal, proteger contra radicales libres y fagocitar los segmentos externos de los fotorreceptores, permitiendo su continua renovación. Además, las células del EP aportan el retinol que forma parte de los fotopigmentos (Young y Bok, 1969).

Capa de los segmentos de los fotorreceptores (SF): Está compuesta por los segmentos externos e internos de las células sensoriales, conos y bastones. Las uniones de los fotorreceptores con las expansiones esclerales de las células de Müller forman la membrana limitante externa (MLE).

En teleósteos, anfibios y aves se producen contracciones y extensiones de los segmentos de los fotorreceptores que permiten la adaptación a un tipo u otro de visión (Douglas y Wagner, 1982; Burnside *et al.*, 1993; Kolbinger *et al.*, 1996).

Capa nuclear externa (CNE): Constituida por los cuerpos celulares de conos y bastones.

Capa plexiforme externa (CPE): En esta capa se producen las conexiones sinápticas entre los fotorreceptores y los diferentes tipos de interneuronas: células bipolares, interplexiformes y horizontales. Además, también se pueden encontrar células microgliales.

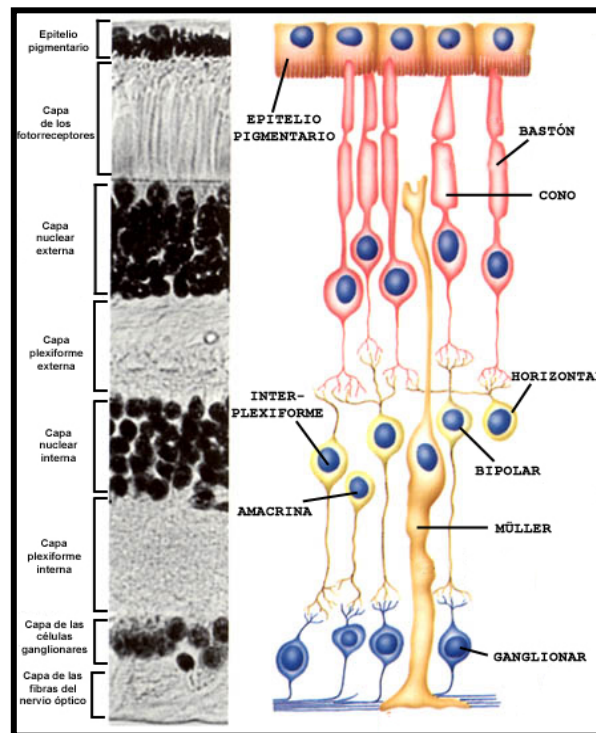
Capa nuclear interna (CNI): Capa donde se localizan los somas de todas las interneuronas retinianas y de las células de Müller.

Capa plexiforme interna (CPI): Contiene los axones de las células bipolares así como las dendritas de las células amacrinas, interplexiformes y ganglionares. Al igual que en la CPE, también pueden encontrarse células de microglía. La CPI está dividida en diferentes niveles funcionales formados por las ramificaciones de las células bipolares, amacrinas y ganglionares.

Capa de las células ganglionares (CCG): Está compuesta tanto por los somas de las células ganglionares como por los de las células amacrinas desplazadas.

Capa de las fibras del nervio óptico (CFNO): Constituida por los axones de las células ganglionares. En esta capa también se encuentran células gliales. En la parte más vitreal de la retina, entre la CFNO y los vasos sanguíneos se localiza la membrana limitante interna (MLI). Está formada por las expansiones vitreales de las células de Müller.

Esta estructura laminar de la retina es una característica muy conservada entre los diferentes grupos de vertebrados. Sin embargo, existen grandes variaciones en cuanto a la distribución de las células, las conexiones sinápticas y los neurotransmisores que utilizan. En los teleósteos (categoría a la que pertenecen la mayoría de los peces óseos actuales) es más difícil que en otros grupos establecer un modelo único, debido a la gran cantidad de especies y la gran diversidad de hábitats y modos de vida que presentan (Wagner, 1990).



**Fig. 2:** Esquema de la retina donde se muestran las diferentes capas y los tipos celulares que la integran (<http://tutor.lscf.ucsb.edu>).

### 1.1.2 Células retinianas

En la retina se han descrito tres tipos básicos de células gliales: astrocitos, microglía, y un tipo especial de glía radial denominada células de Müller; en algunas especies también se han encontrado oligodendrocitos. Los tipos neuronales se pueden agrupar en tres categorías: las células sensoriales o fotorreceptores, varios tipos de interneuronas (bipolares, horizontales, interplexiformes y amacrinas), y un solo tipo de células de proyección, las células ganglionares.

Fotorreceptores: Son células muy especializadas que poseen una morfología

## Introducción

bastante peculiar. El cuerpo celular se localiza en la CNE y de él parte un axón en dirección vitreal que contacta con las células bipolares y horizontales en la CPE. En sentido escleral se forman los segmentos externos e internos que se introducen en el espacio subretinal hacia el EP. El segmento externo contiene cientos de discos membranosos, orientados de forma transversal, en los que se insertan los pigmentos fotosensibles (Kolb *et al.*, 2000). Estos discos sufren una renovación continua, mientras que en la región basal se produce la biogénesis, en la zona apical el EP fagocita los discos más viejos (Young, 1971).



**Fig. 3:** Esquema de los dos tipos de fotorreceptores presentes en la retina, conos y bastones ([www.martin-missfeldt.de](http://www.martin-missfeldt.de)).

En todos los grupos de vertebrados existen dos tipos de fotorreceptores que se clasifican según la morfología del segmento externo, es corto y de forma cónica en los conos, y más largo y cilíndrico en los bastones (Fig. 3). Aunque en ambos casos los somas celulares se localizan en la CNE, éstos se distribuyen de manera específica en el espesor de la capa. Mientras que los somas de los conos se sitúan formando una monocapa en la región más vitreal, los cuerpos celulares de los bastones constituyen el resto de la CNE formando varias hileras (Kolb *et al.*, 2000). Conos y bastones constituyen sistemas diferentes en la recepción de la señal luminosa. Los bastones contienen rodopsina y son responsables de la visión escotópica, sensibles únicamente en condiciones de baja luminosidad.

A partir de cierto nivel de iluminación, los bastones se saturan e intervienen los conos, capaces de registrar cambios rápidos de la intensidad de luz, permitiendo la visión en color (Kolb *et al.*, 2000). Mientras que los bastones forman un sólo tipo morfológico y funcional, existen distintos tipos de conos según la opsina que poseen. El número y naturaleza de los pigmentos visuales expresados en los fotorreceptores varía considerablemente entre las diferentes especies. La mayoría de los mamíferos tienen dos tipos de conos (cono rojo y cono azul) pero en el caso de los primates existen tres tipos de conos que dan lugar a la visión tricromática: rojos, verdes y azules (Kolb *et al.*, 2000). Los pájaros diurnos y los reptiles expresan cinco tipos de opsinas en los diferentes fotorreceptores, una en bastones y las otras cuatro en los conos, dando visión tetracromática. En el caso de los teleósteos existe mucha más variabilidad, ya que se han adaptado prácticamente a todos los hábitats acuáticos y la importancia de la visión cromática dependerá del ambiente y de su ciclo vital. Podemos

encontrar desde visión monocromática en peces abisales hasta dicromática en peces de aguas turbias, tricromática en peces de arrecifes coralinos e incluso tetracromática para los peces de aguas dulces cristalinas (Goldsmith, 1980; Robinson *et al.*, 1993; Hughes *et al.*, 1998).

En muchas especies los conos se concentran en regiones especializadas para conseguir una mayor agudeza visual. El caso más complejo es la fovea de primates y aves raptoras, situada en la retina central. Esta zona carece de bastones y presenta una depresión de todas las capas vitreales (Kolb *et al.*, 2000). En algunos peces también existe una fovea situada en la retina temporal, aunque la depresión sólo afecta a la CFNO. En otros casos no existe una depresión asociada y se denomina "área de alta densidad celular". La localización de estas áreas en la retina está relacionada con el hábito alimenticio de cada especie (Wagner, 1990; Easter, 1992; Beaudet *et al.*, 1997).

### Interneuronas

a) *Células horizontales*: Son células de gran tamaño situadas horizontalmente en la región más escleral de la CNI. Sus dendritas se extienden por toda la CPE y realizan conexiones sinápticas con fotorreceptores, células bipolares, células interplexiformes y en algunos casos con células amacrinas (Marc y Liu, 1984; Marshak y Dowling, 1987). Las células horizontales modulan la información que pasa de los fotorreceptores a las células bipolares. Se ha descrito que las células horizontales no solo reciben información de los fotorreceptores, sino que también envían información de vuelta a los mismos (Baylor *et al.*, 1971; Fuortes *et al.*, 1973; O'Bryan, 1973; Burkhardt, 1977; Lasansky, 1981; Wu, 1991). Su campo receptivo es bastante grande, y se hace aún mayor al presentar uniones *gap* entre células horizontales de un mismo tipo (Teranishi *et al.*, 1983; Wolburg y Kurz-Isler, 1985). Además, la permeabilidad conferida por las uniones *gap* les permite integrar información de diferentes tipos de fotorreceptores. Fisiológicamente las células horizontales se dividen en dos tipos: un tipo codifica la información de luminosidad y otro la de cromaticidad (Svetichin y Macnichel, 1959). Morfológicamente las células horizontales se dividen en función de la presencia de un axón corto o la ausencia de axón. La mayoría de los vertebrados contienen al menos un tipo de células horizontales de cada grupo, sin embargo, encontramos excepciones, como en humanos, donde sólo hay células horizontales con axón. En la mayoría de los teleósteos estudiados las células horizontales sin axón contactan exclusivamente con bastones.

b) *Células bipolares*: Su soma se localiza en la región medial de la CNI, y de él parten

procesos en sentidos opuestos. Las dendritas se dirigen hacia la CPE y allí se ramifican realizando sinapsis con fotorreceptores, células horizontales y células interplexiformes. El axón se extiende hacia la CPI y establece sinapsis con células ganglionares y amacrinas. Estas interneuronas transfieren la señal visual directamente desde los fotorreceptores hasta las células ganglionares estableciendo las vías de respuesta *ON* y *OFF*. Las células bipolares responden de manera diferente al glutamato liberado por los fotorreceptores dependiendo del tipo de receptor que posean (Werblin y Dowling, 1969). Mientras que las bipolares *OFF* se activan en respuesta al glutamato, las células *ON* se inhiben; de esta manera se establecen las vías *OFF* (de respuesta a la oscuridad) y *ON* (de respuesta a la luz) respectivamente. Esas diferencias fisiológicas tienen cierta correspondencia morfológica: las bipolares *ON* presentan los terminales sinápticos en la mitad vitreal de la CPI y las bipolares *OFF* presentan dichos terminales en la parte escleral de la CPI (Famiglietti y Kolb, 1976; Wu *et al.*, 2000). Las clasificaciones de las células bipolares tienen en cuenta los tipos de fotorreceptor con que contactan y el tamaño del campo dendrítico. En la retina humana se han descrito 9 tipos morfológicos de células bipolares (Boycott y Wässle, 1991, Kolb *et al.*, 1992; Mariani 1984, 1985). Ocho de ellos corresponden a células bipolares de cono mientras que sólo existe un tipo de célula bipolar de bastón. En los ciprínidos las poblaciones de células bipolares son bastante más complejas, dividiéndose en bipolares de cono, con 12 clases distintas, y bipolares mixtas, de cono y de bastón, que incluyen 5 clases (Marc y Cameron, 2001).

c) *Células interplexiformes*: Su soma se localiza en la porción central de la CNI y presenta ramificaciones que se extienden en las dos capas plexiformes. Estas células reciben aferencias sinápticas desde la CPI y envían eferencias hacia la CPE. Es el único tipo celular que distribuye la información sensorial centrífugamente enviándola desde células amacrinas a horizontales y bipolares (Dowling y Ehinger, 1978; Marshak y Dowling, 1987). En el carpín se han descrito dos tipos de células interplexiformes: dopaminérgicas y glicinérgicas. Las dopaminérgicas se localizan a la altura de las células amacrinas y la mayor parte de las dendritas se estratifican en la CPI, y envían ramificaciones que llegan hasta la CPE. Las glicinérgicas tienen el soma a la altura de las células bipolares y casi todas sus dendritas primarias ascienden hasta la CPE, enviando desde allí procesos a la CPI (Kalloniatis y Marc, 1990; Wagner, 1990). Además, parecen regular los movimientos retinomotores (Wagner y Wulle, 1992; Van Haesendonck *et al.*, 1993) y reciben aferencias del nervio olfatorretinal (o terminal) (Stell *et al.*, 1984; Zucker y Dowling, 1987; Uchiyama, 1990).

d) *Células amacrinas*: Presentan un soma localizado en la región más vitreal de la CNI, aunque también existen células amacrinas en la CCG denominadas amacrinas desplazadas; estas células pueden suponer desde un tercio hasta la mitad de las células de dicha capa (Hughes y Wieniawa-Narkiewicz, 1980). Las prolongaciones de ambos tipos de amacrinas se extienden por toda la CPI. Se han definido como células típicamente sin axón, si bien algunos tipos de células amacrinas presentan largos procesos que pueden actuar como verdaderos axones, aunque estas prolongaciones permanecen siempre dentro de la retina. Estas interneuronas forman la vía de asociación lateral a nivel de la CPI, ya que reciben aferencias de células bipolares y de otras células amacrinas, y establecen a su vez conexiones con células ganglionares y células bipolares. Morfológicamente son las células más diversificadas de la retina de vertebrados, además, pueden contener prácticamente cualquier neurotransmisor o neuromodulador presente en el resto del Sistema Nervioso. Debido a esta variabilidad es complicado realizar una clasificación. Así, se han descrito más de 20 tipos diferentes de células amacrinas en la retina de gato (Kolb y Nelson, 1981) y 43 tipos en un teleosteo como el rutilo (Wagner y Wagner, 1988). Funcionalmente, en los teleosteos existen 4 grupos de células amacrinas: de respuesta *ON* (que reciben aferencias de bipolares *ON*), de respuesta *OFF* (que las reciben de bipolares *OFF*), de respuesta transitoria (que responden al inicio y al final del estímulo luminoso) y de respuesta codificada para el color (Djamgoz *et al.*, 1990; 2001).

Células de proyección: Las células ganglionares son las únicas células de proyección de la retina. Su principal función es recoger la información visual procedente tanto de la vía vertical (de fotorreceptor a bipolar, y de ésta última a ganglionar), como de la vía horizontal (de fotorreceptor a horizontal, a bipolar, a amacrina y de ésta última a ganglionar) y enviarla a centros superiores encefálicos.

Las células ganglionares poseen un cuerpo celular voluminoso localizado en la CCG, aunque también se han descrito células ganglionares desplazadas en la CNI (Hayes y Holden, 1983; Hitchcock y Easter, 1986). Sus dendritas se ramifican en la CPI y contactan con células bipolares y amacrinas. Su axón parte en dirección vitreal discurriendo paralelo a la superficie retiniana (formando la CFNO) hasta alcanzar la papila óptica. En este punto el conjunto de axones atraviesa las capas de la retina y sale del globo ocular formando el nervio óptico (NO). La siguiente estación de relevo de la información visual es el núcleo geniculado lateral, en mamíferos, y el techo óptico en el caso de los peces (Stuermer, 1988; Burrill y

Easter, 1994).

Se han descrito más de 20 tipos de células ganglionares según el tamaño del soma y la forma de las dendritas, aunque el 50% de las células ganglionares lo constituyen dos, las M (o grandes) y las P (o pequeñas) (Boycott y Wässle, 1974; Leventhal *et al.*, 1981). En los últimos años se ha descrito un nuevo tipo de célula ganglionar fotosensible que actúa de forma independiente a los fotorreceptores. Este tipo celular contiene en su membrana una molécula reactiva a la luz denominada melanopsina, que pertenece a la familia de las opsinas. Se ha descrito que estas células están involucradas en la regulación del ritmo circadiano y los reflejos pupilares (Foster *et al.*, 1991; Berson, 2003).

### Células gliales

a) *Células de Müller*: Son las células gliales predominantes en la retina y son las únicas células de estirpe glial que se originan a partir de progenitores retinianos (Turner y Cepko, 1987). Pertenecen a un grupo de astrocitos denominados glía radial debido tanto a su morfología, ya que atraviesan todas las capas de la retina, como a las funciones que desarrollan. Su soma es poligonal y alargado, y se localiza en la región central o vitreal de la CNI. Presentan dos largas prolongaciones opuestas que atraviesan todo el espesor de la retina, formando la MLE en la región escleral y la MLI en la zona vitreal. En la MLE las expansiones de las células de Müller establecen conexiones con otras células de Müller y con fotorreceptores; además emiten una serie de microvellosidades hacia el espacio subretinal (Reichenbach y Robinson, 1995). Los procesos que se dirigen hacia el vitreo contactan con otras células de Müller y además forman una lámina basal. Las abundantes ramificaciones de ambos procesos envuelven a las neuronas retinianas y organizan en haces a los axones de las células ganglionares en la CFNO (Reichenbach y Robinson, 1995). Las células de Müller realizan multitud de funciones que son imprescindibles para las neuronas retinianas: no solo sirven de soporte, sino que están implicadas en el procesamiento de la información visual, el metabolismo energético, la protección frente a radicales libres, la formación de la barrera hematorretiniana, la regulación de la homeostasis y el reciclaje del exceso de neurotransmisores (Newman y Reichenbach, 1996; Matsui *et al.*, 1999; Bringmann *et al.*, 2000).

La célula de Müller es un tipo celular muy polivalente que, además de realizar funciones típicas de la glía, es capaz de responder ante una lesión desdiferenciándose y formando progenitores neurales. En peces (Fausett y Goldman, 2006; Raymond *et al.*, 2006;



Fimbel *et al.*, 2007), aves (Fischer y Reh, 2003; Fischer, 2005) y ratón (Ooto *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2005), se ha descrito que, tras una lesión, las células de Müller son capaces de dividirse y de expresar marcadores neurales. Además, recientemente se ha demostrado que en el pez cebra las células de Müller son capaces de generar progenitores del linaje de bastón en condiciones normales, aunque con una tasa de proliferación muy baja (Bernardos *et al.*, 2007).

*b) Astrocitos:* Se caracterizan por su soma aplanado y sus procesos radiales, aunque su morfología varía según su localización; pasan de ser fusiformes en la retina central a tener una morfología estrellada a nivel de la retina periférica (Schnitzer, 1988). Se localizan casi exclusivamente a nivel de la CFNO. Inicialmente se propuso que los astrocitos podían derivar de las células de Müller (Reichenbach y Wohlrab, 1986), aunque más tarde se comprobó que en realidad se forman a partir de precursores de astrocitos que migran por el NO hacia la retina (Ling y Stone, 1988; Watanabe y Raff, 1988; Kopatz y Distler, 2000; Chu *et al.*, 2001; Tsai y Miller, 2002). En la retina su principal función está relacionada con el sistema vascular, ya que durante el desarrollo son los encargados de inducir y guiar el crecimiento de los vasos por la retina (Zhang *et al.*, 1999; Dorrell *et al.*, 2002; Gariano, 2003). En la retina de teleósteos los únicos estudios que se han realizado muestran una morfología y distribución similar a la descrita en mamíferos (Vecino *et al.*, 1997). Sin embargo, han sido ampliamente estudiados en la cabeza del nervio óptico (CNO) y en el propio NO, en los que se ha analizado el comportamiento de los astrocitos durante procesos de crecimiento, degeneración y regeneración axonal (Lillo *et al.*, 1998; Lillo *et al.*, 2002).

*c) Microglía:* Las células microgliales tienen una morfología multipolar, con pequeños cuerpos celulares y unos procesos irregulares y cortos. Su localización es muy variable en los diferentes grupos de vertebrados. En teleósteos se distribuyen principalmente en las capas plexiformes y en la CFNO, y en menor proporción en las capas nucleares. La función más importante de la microglía se manifiesta en condiciones patológicas. Ante cualquier daño o lesión se transforma en microglía reactiva, proliferando y adquiriendo actividad fagocítica. Además de eliminar residuos, las células microgliales son capaces de modular la respuesta inmune y producir tanto factores tróficos como sustancias neurotóxicas (Moore y Thanos, 1996; Stoll y Jyer, 1999; Chen *et al.*, 2002). Existe mucha controversia con respecto a su origen. La hipótesis más aceptada es que son de origen mesodérmico, formándose a partir de células hematopoyéticas (Stoll y Jyer, 1999; Navascués *et al.*, 2000). Sin embargo, algunos autores defienden una procedencia neuroectodérmica, demostrando la existencia de

un precursor glial común para microglía y astrocitos (Fedoroff *et al.*, 1997).

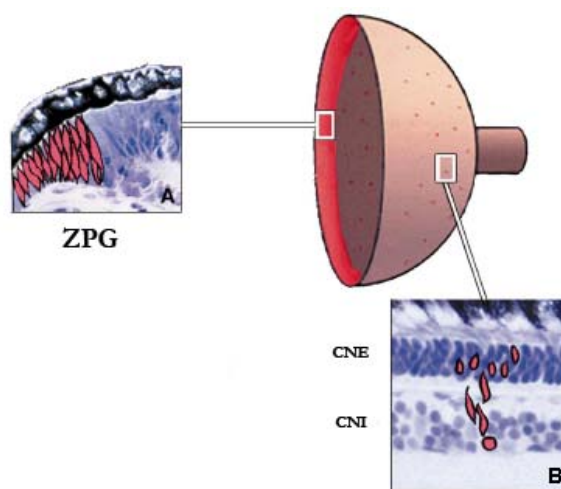
d) *Oligodendrocitos*: La función típica de los oligodendrocitos es la mielinización de los axones neuronales. Mientras que en mamíferos no hay ni oligodendrocitos ni axones mielinizados en la retina, en aves se han descrito oligodendrocitos en la CFNO y en la CCG (Nakazawa *et al.*, 1993; Cho *et al.*, 1999; Won *et al.*, 2000). En teleósteos se han observado oligodendrocitos y axones mielinizados en la CFNO (Wolburg, 1980; Lillo *et al.*, 1998). De hecho, en el carpín se ha propuesto que los axones no mielinizados (siempre más superficiales) corresponden a células ganglionares jóvenes, y los mielinizados a ganglionares más antiguas (Easter *et al.*, 1984), si bien se ha descrito que algunos de los axones mielinizados corresponden a fibras retinópetas (Uchiyama, 1990).

## 1.2 Neurogénesis en la retina adulta de teleósteos

En el SNC de vertebrados la neurogénesis no finaliza al alcanzar la edad adulta, ya que se han descrito zonas proliferativas capaces de generar nuevas células que se diferencian y se integran en el tejido. Sin embargo, no todos los grupos de vertebrados muestran la misma potencialidad para generar células *de novo*. En mamíferos la neurogénesis adulta se restringe a tres regiones cerebrales: el epitelio olfatorio, la zona subventricular y el giro dentado del hipocampo (Alvarez-Buylla y García-Verdugo., 2002; Calof *et al.*, 2002; Taupin y Gage, 2002). En anfibios (Hollyfield, 1968), peces (Zupanc, 1999; Ekström *et al.*, 2001) y reptiles (Font *et al.*, 2001) existen varias zonas proliferativas activas en las regiones principales del SNC adulto. En el pez cebra se han descrito entre 50 y 60 zonas proliferativas (Hinsch y Zupanc, 2006) que se localizan siempre en la zona ventricular o bien en regiones que corresponden a porciones ventriculares embrionarias (Zupanc, 1999; Ekström *et al.*, 2001). Utilizando marcadores de células en división se ha descrito que el 0,2% del total de células del encéfalo de un teleósteo son células progenitoras (Zupanc, 1999), frente al 0,03% que se ha observado en ratones (Williams, 2000). La presencia de células mitóticamente activas en el encéfalo de vertebrados anamniotas es la base de la capacidad para crecer a lo largo de toda la vida del animal y para regenerar tras sufrir una lesión (Easter, 1983; Raymond y Hitchcock, 2000). Una de las regiones del SNC más utilizadas para estudiar el crecimiento continuo y la regeneración es el sistema visual de teleósteos.

### 1.2.1 Crecimiento continuo de la retina

Müller en 1952 describió que la retina de teleósteos crece de forma continuada durante toda la vida adulta del animal. Este crecimiento se produce mediante dos mecanismos: adición de nuevas células y expansión del tejido maduro. La causa principal del aumento de volumen de la retina es la expansión del tejido, debido a un incremento de los procesos celulares, lo que provoca una disminución de la densidad celular (Johns y Easter, 1977; Macy y Easter, 1981; Kock, 1982). La segunda causa es la generación de nuevas células a partir de dos poblaciones de retinoblastos (Fig. 4). En la región más periférica se localiza un anillo de células neuroepiteliales, denominado zona periférica germinal (ZPG) (Müller, 1952; Meyer, 1978), que es la responsable de la formación de nueva retina. Además, existe otra población de progenitores neurales, el linaje de los progenitores de bastón (Johns, 1982), que se localizan en regiones centrales y que generan bastones a lo largo de toda la vida del animal.

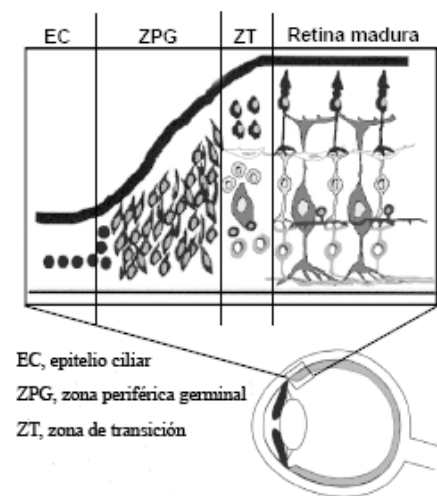


**Fig. 4:** Localización de las dos poblaciones de progenitores en la retina de teleósteos, la ZPG en la región periférica (A) y el linaje de bastón en la zona central (B). Modificado de Otteson *et al.*, 2001.

**Zona Periférica Germinal:** Se trata de un remanente de la copa óptica embrionaria formado por una población de células proliferativas que se distribuyen formando un círculo continuo en el margen de la retina (Müller, 1952; Grun, 1975). La ZPG se continúa por su extremo central con la retina neural y por su extremo periférico con el estrato no pigmentado del epitelio ciliar (Olson *et al.*, 1999). La ZPG, además de autorrenovarse, es capaz de originar todos los tipos celulares de la retina durante toda la vida del animal (Müller, 1952; Otteson y Hitchcock, 2003).

El crecimiento continuo de la retina se produce desde la ZPG por la aposición de anillos concéntricos de células, desde la periferia hacia el centro, por lo que las células más jóvenes son las que se encuentran en las regiones más periféricas de la retina (Scholes, 1979; Easter, 1992). Las células recién formadas en la ZPG se mantienen en su lugar de origen hasta que se forma una nueva oleada de células más periféricas que van desplazando a las

anteriores (Scholes, 1979; Rusoff y Easter, 1980; Easter, 1992).



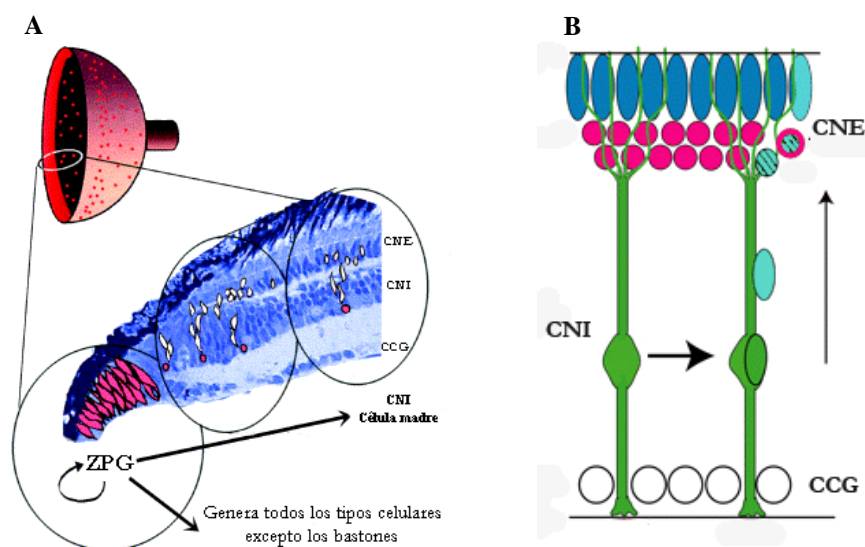
**Fig. 5:** Esquema de la retina periférica de teleósteos. Modificada de Hitchcock *et al.*, 2004.

De este modo, entre la ZPG y la retina madura, existe una zona de transición (ZT) donde la laminación no está todavía establecida y las células están aún diferenciándose (Fig. 5) (Olson *et al.*, 1999; Lillo *et al.*, 2001). La diferenciación de las distintas capas de la zona de transición no es simultánea sino que la primera capa que se distingue es la CCG, después la CNI y la CNE (Olson *et al.*, 1999). Como ya hemos indicado anteriormente, las únicas células que no se diferencian en la zona de transición ni en la retina adyacente son los bastones (Johns, 1982; Raymond, 1985).

**Linaje de los bastones:** En teleósteos, la formación de los bastones se encuentra retrasada con respecto al resto de células retinianas, ya que no se forman durante la retinogénesis, sino posteriormente en regiones maduras de la retina (Raymond, 1991). En el pez cebra, por ejemplo, tras la eclosión la CNE está compuesta únicamente por una hilera de conos en diferenciación, y no es hasta 2 ó 3 días después cuando aparecen los primeros núcleos de bastones en la CNE (Sandy y Blaxter, 1980; Johns, 1982; Branchek y Bremiller, 1984; Raymond, 1991). Así, en estadios adultos, buena parte de la retina periférica carece de bastones (Johns, 1982; Lillo *et al.*, 2001).

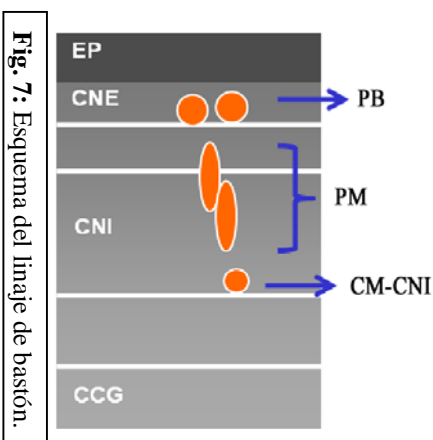
Tradicionalmente se ha descrito que los progenitores de bastón tienen un único origen, la ZPG (Fig. 6A). Según esta teoría, en la retina recién formada queda un remanente de células inmaduras de la ZPG, que se mantienen indiferenciadas y generan progenitores retinianos que se diferenciarán a bastón (Otteson *et al.*, 2001; Otteson y Hitchcock, 2003). Sin embargo, recientemente, se ha demostrado que existe otra fuente de progenitores, las células de Müller (Bernardos *et al.*, 2007; Klassen *et al.*, 2008). Estas células, bajo determinados estímulos, podrían ser reclutadas para generar nuevas células progenitoras (Fig. 6B). Estos dos modelos no tendrían porque ser excluyentes, ya que se ha observado que la generación de progenitores a partir de las células de Müller se produce principalmente como respuesta a una lesión, y en una retina intacta su tasa de proliferación es muy baja. Además, estudios realizados con mutantes de pez cebra han demostrado que la respuesta regenerativa ante la

eliminación selectiva de los bastones no está mediada por las células de Müller sino por el propio linaje de precursores de bastón (Morris *et al.*, 2008). Sin embargo, la pérdida selectiva de los conos sí consigue activar a las células de Müller provocando su reentrada en el ciclo celular y la formación de nuevos progenitores retinianos (Morris *et al.*, 2008).



**Fig. 6:** A) Formación del linaje de bastón a partir de la ZPG (Modificado de Otteson *et al.*, 2001). B) Generación de nuevos progenitores de bastón a partir de una célula de Müller (Modificado de Bernardos *et al.*, 2007).

Se han utilizado muchas especies de teleósteos para caracterizar el linaje de bastones: carpín (Johns, 1982; Raymond, 1985; Cid *et al.*, 2002), trucha (Julián *et al.*, 1998), tenca y pez cebra (Cid *et al.*, 2002; Raymond *et al.*, 2006). Según estos estudios, en el linaje de bastones se distinguen tres tipos de progenitores dependiendo de su localización, la morfología de su núcleo y su potencial proliferativo (Fig. 7):



*Células madre de la CNI:* Son células redondeadas, indiferenciadas y prácticamente quiescentes (Otteson *et al.*, 2001; Otteson y Hitchcock, 2003). Se localizan en la región más vitreal de la CNI, se caracterizan por expresar Pax6 y aunque tienen capacidad de proliferar lo hacen muy lentamente (Otteson *et al.*, 2001; Otteson y Hitchcock, 2003).

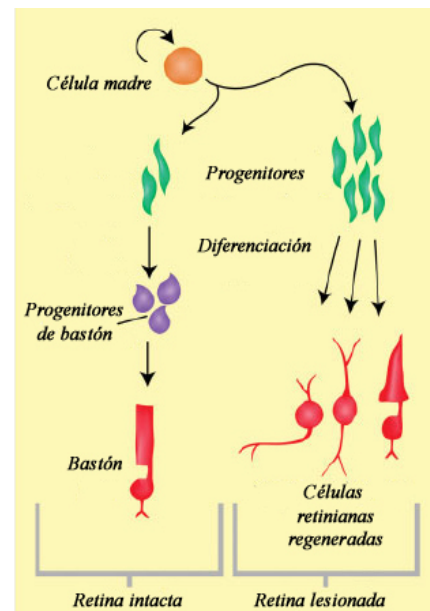
*Progenitores en migración:* Cuando las células madre de la CNI se dividen, además de autorrenovarse, generan los progenitores que migran en dirección a la CNE (Otteson y

Hitchcock, 2003). Estas células tienen una morfología alargada con uno o dos procesos vitreales y un proceso escleral (Raymond y Rivlin, 1987). La migración se produce tanto en células aisladas como en grupos de 3 ó 4 células asociadas a células de Müller (Raymond y Rivlin, 1987). Estas células migran a través de la CNI y la CPE hasta llegar a la CNE.

**Precusores de bastón:** Tras la migración de los progenitores hasta la CNE, estos se convierten en el tercer tipo de progenitores, los precusores de bastón (Julián *et al.*, 1998). Presentan uno o dos procesos esclerales que no sobrepasan la MLE y nunca presentan procesos vitreales (Raymond y Rivlin, 1987). Dentro del linaje de los bastones son las células mitóticamente más activas, y por ello fueron las primeras en ser descritas (Sandy y Blaxter, 1980; Johns, 1982; Raymond, 1985).

En una retina intacta las células de linaje de bastón solamente forman bastones, sin embargo, ante una lesión son capaces de generar cualquier tipo celular retiniano. Se ha demostrado que dentro del linaje de bastón, únicamente las células madre de la CNI son lo suficientemente inmaduras como para producir progenitores que se diferencien a otros tipos celulares, ya que los precusores de bastón ya están comprometidos para diferenciarse a bastón (Morris *et al.*, 2008).

**Fig. 8:** Esquema de las células del linaje de bastón en una retina intacta y en una retina lesionada. Modificado de Morris *et al.*, 2008.



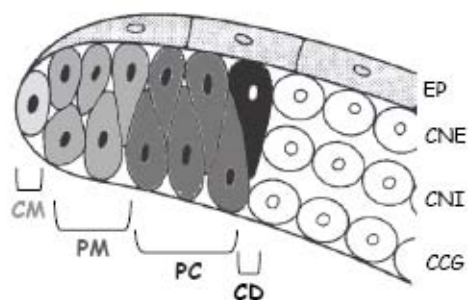
### 1.2.2 Progenitores en la retina de otros vertebrados

Como norma general, la neurogénesis en el SNC adulto se ha ido reduciendo progresivamente en el transcurso de la evolución de los vertebrados, no sólo en la capacidad de proliferación, sino también en la capacidad para formar ciertos tipos celulares (Kubota *et al.*, 2002). Lo mismo ha ocurrido en la retina, mientras que la presencia de progenitores en la retina central es exclusiva de peces, se han descrito ZPGs en la retina de varios grupos de vertebrados. Sin embargo, cuanto más se avanza en la escala filogenética, la potencialidad y el número de estas células disminuye.

**Anfibios:** En este grupo la región periférica de la retina se denomina zona marginal ciliar (ZMC) (Hollyfield, 1968; Straznický y Gaze, 1971; Umino y Saito, 2002), y en



muchos aspectos está más estudiada que la ZPG de teleósteos. La ZMC se divide en 4 regiones según el grado de diferenciación y la capacidad de proliferación que posean las células. En la región más periférica se disponen las células multipotentes, con capacidad de autorrenovación y con un ciclo celular lento; en la parte medial se localizan retinoblastos



**Fig. 9:** Organización de los retinoblastos en anfibios. CM, células madre retinianas; PM, progenitores multipotentes; PC, progenitores comprometidos; CD, células en diferenciación. Tomado de Harris y Perron, 1998.

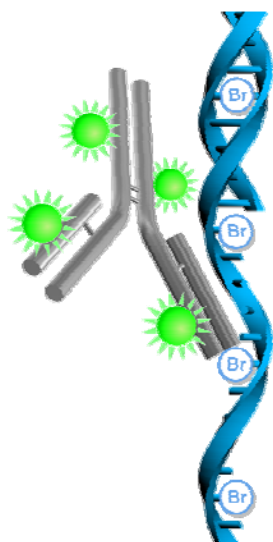
multipotentes con una capacidad de proliferación más activa. A continuación progenitores comprometidos hacia un linaje concreto; y en la zona adyacente a la retina central se localizan las células que ya han comenzado a diferenciarse (Fig. 9) (Perron *et al.*, 1998; Perron y Harris, 2000; Hitchcock *et al.*, 2004). Esta capacidad de crecimiento continuado es muy importante tanto en anfibios como en teleósteos, ya que sólo la región central se forma durante la retinogénesis (Kubota *et al.*, 2002; Moshiri *et al.*, 2004).

Aves y mamíferos: En estos grupos de vertebrados también se ha observado crecimiento de la retina tras la eclosión o el nacimiento, aunque por un tiempo limitado (Perron y Harris, 2000; Kubota *et al.*, 2002). En principio se consideró que este crecimiento se debía exclusivamente a una distensión del tejido, sin embargo, estudios recientes han demostrado la existencia de proliferación celular. En algunas especies de aves se ha descrito una zona proliferativa que se mantiene activa hasta dos meses después de la eclosión, y que además, comparte muchas características con la ZPG de peces y con la ZMC de anfibios (Kubota *et al.*, 2002). Sin embargo, la potencialidad de estos progenitores está restringida, ya que parece limitada a ciertos tipos celulares (Fischer y Reh, 2000). En el caso de la rata y el ratón, la actividad mitótica en estadios tempranos tras la retinogénesis se restringe a células del epitelio ciliar (Ahmad *et al.*, 2000; Tropepe *et al.*, 2000; Kubota *et al.*, 2002). Se ha comprobado, además, que las células del estrato pigmentado del epitelio ciliar se comportan *in vitro* como células madre (Ahmad *et al.*, 2000; Tropepe *et al.*, 2000), aunque *in vivo* parecen estar quiescentes.

### 1.3 Caracterización de los progenitores en la retina adulta

En la retina adulta de teleósteos los progenitores de bastón se encuentran dispersos a lo largo de la retina central. El grado de diferenciación de los progenitores dependerá de la capa en la que se encuentren, los más inmaduros se localizan en la CNI y a medida que avanzan hacia la CNE se diferencian progresivamente a bastones. Esto implica que tanto la tasa de proliferación como el patrón de expresión de marcadores neurales en estas células son variables, lo que dificulta enormemente su identificación y su posterior caracterización.

Actualmente el método más utilizado para identificar células progenitoras en el SNC son los marcadores de proliferación celular. El uso de dichos marcadores presenta una desventaja ya que también detectan células gliales en división. Sin embargo, esto no es un inconveniente en nuestro modelo ya que en las capas más esclerales de la retina sólo existe un tipo de célula glial, las células de Müller, y en condiciones normales su tasa de división es muy baja. Existen numerosos marcadores para detectar proliferación celular, entre ellos se encuentran los nucleótidos marcados o los análogos de nucleótidos, como la timidina tritiada, la iododeoxiuridina, y más recientemente la 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU), así como diferentes proteínas implicadas en el ciclo celular, como es el caso de la PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) y la histona H3 fosforilada. Entre los marcadores más utilizados se encuentra la BrdU que es un nucleótido sintético análogo a la timidina.



**Fig. 10:** Incorporación de BrdU ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)).

Tras inyectar BrdU al animal de experimentación, la célula, durante la replicación del ADN, añadirá preferentemente BrdU en lugar de la timidina correspondiente. De esta manera, la nueva hebra de ADN puede detectarse mediante una inmunohistoquímica con anticuerpos específicos contra BrdU (Fig. 10). Estudios *in vitro* han demostrado que las células en división tienen una alta tasa de incorporación de BrdU, que oscila entre un 99,8% y un 100% (Bick y Davidson, 1974). Por ello, la BrdU presenta una ventaja que no poseen las proteínas implicadas en el ciclo celular, ya que mientras la PCNA y la histona H3 fosforilada sólo marcan las células que se encuentren en una fase determinada del ciclo celular, la incorporación de BrdU permite

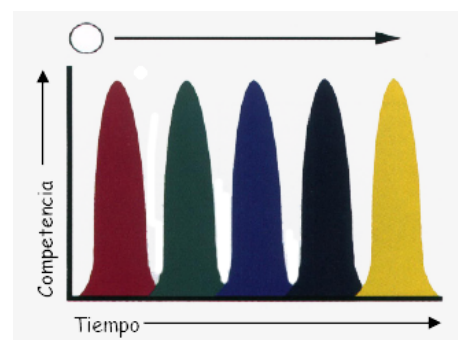


detectar todas las células que se hayan dividido desde la aplicación de la primera dosis hasta el sacrificio del animal. Además, la utilización de la histona H3 fosforilada presenta mucha controversia, ya que se han descrito células en interfase positivas para dicha proteína (Prigent y Dimitrov, 2003). Una vez localizados los progenitores de bastón en la retina madura, podremos estudiar el patrón de expresión de diferentes marcadores moleculares.

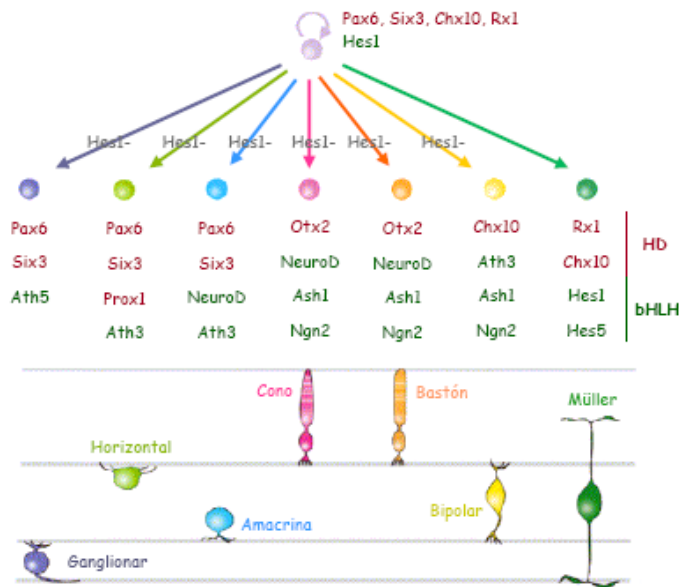
Para ello, estudiaremos qué proteínas están implicadas en la regulación, migración y diferenciación de los progenitores. En los últimos años, los marcadores más utilizados son los implicados en la regulación de la transcripción. En el caso de la retina se conoce qué familias de factores de transcripción se expresan en cada uno de los linajes de retinoblastos a lo largo de la retinogénesis. Muchos de estos factores de transcripción también están implicados en la regulación de los progenitores y su diferenciación en la

retina madura, lo que permite realizar un análisis mucho más específico. Todos los tipos celulares de la retina derivan de una población común de progenitores (Wetts y Fraser, 1988; Cepko *et al.*, 1996), y el control de este proceso durante la retinogénesis es muy complejo. Cepko y colaboradores (1996) propusieron un modelo para explicar este proceso, el modelo de competencia (Fig. 11). Según este esquema, los retinoblastos pasan de un estado de competencia a otro, de forma unidireccional.

En cada estadio de competencia, las células se capacitan para generar tipos celulares determinados. Ciertos factores de transcripción, principalmente de las clases bHLH (proteínas con dominio hélice-bucle-hélice básico) y HD (proteínas con homeodominio), son fundamentales en la regulación intrínseca de este proceso (Hatakeyama y Kageyama, 2004). La expresión de ciertos factores de transcripción inicia una cascada de reacciones que provoca la salida del ciclo celular y la diferenciación de la célula (Ahmad *et al.*, 2004). El tipo neuronal que se va a formar depende de la combinación de factores HD y bHLH que exprese el progenitor (Fig. 12) (Marquardt, 2003; Hatakeyama y Kageyama, 2004). Muchos de los factores de transcripción que se expresan durante la retinogénesis también están implicados en la regulación de los progenitores de bastón y su diferenciación en la retina madura.



**Fig. 11:** Modelo de competencia. Cada color indica la génesis de un grupo de tipos celulares concretos. Tomado de Cepko *et al.*, 1996.



**Fig. 12:** Combinación de factores de transcripción bHLH y HD en la especificación de los distintos tipos celulares retinianos. Figura modificada de Hatakeyama y Kageyama, 2004. Datos tomados de Vetter y Brown, 2001; Marquardt, 2003; Hatakeyama y Kageyama, 2004.

A continuación describimos las características de los marcadores que han sido objeto de estudio en este trabajo, tanto factores de transcripción implicados en la retinogénesis como proteínas implicadas en la migración y diferenciación.

**Pax6:** Los genes de la familia *pax* (*paired box*) codifican factores de transcripción muy importantes en el desarrollo embrionario. Se caracterizan por tener un dominio de unión al ADN denominado *paired*, y algunos miembros de esta familia, incluyendo Pax6, presentan otro dominio de unión, un homeodominio. Diferentes combinaciones de estos dominios permiten a la familia Pax reconocer un amplio rango de sitios de unión al ADN (Jun y Desplan, 1996; Kozmik, 2005). El gen *pax6* presenta un alto grado de conservación en la evolución, con gran homología incluso entre invertebrados y vertebrados (Püschel *et al.*, 1992; Rio-Tsonis *et al.*, 1995; Hirsch y Harris, 1997). En los peces el gen está duplicado. Se han descrito dos genes en el pez cebra, *pax6a* y *pax6b*, cuya divergencia con respecto al gen de mamíferos es equivalente (Nornes *et al.*, 1998).

El gen *pax6* se ha considerado un elemento clave en el desarrollo del ojo, ya que es capaz de inducir la formación ectópica de ojos en *Drosophila melanogaster* y en *Xenopus laevis* (Halder *et al.*, 1995; Chow *et al.*, 1999), o de inhibirla debido a una mutación (Hogan *et al.*, 1986; Glaser *et al.*, 1994). En el neuroepitelio, Pax6 no es necesario para mantener la identidad de los retinoblastos, pero sí afecta a su proliferación y es indispensable para mantener su multipotencialidad (Marquardt *et al.*, 2001). Se ha demostrado que Pax6 es un

activador transcripcional directo de varios genes *bHLH* responsables de la determinación de distintos tipos celulares retinianos. Sin embargo, Pax6 no es suficiente para determinar el destino celular de los progenitores retinianos (Hirsch y Harris, 1997).

En la retina madura de todas las especies analizadas, Pax6 se expresa en la CCG y en el estrato vitreal de la CNI (Krauss *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1992; Püschel *et al.*, 1992; Hitchcock *et al.*, 1996; Belecky-Adams *et al.*, 1997; Hirsch y Harris, 1997; Bhat *et al.*, 1999; Kaneko *et al.*, 1999; Strickler *et al.*, 2001; Ziman *et al.*, 2001). En algunos estudios se han observado células horizontales positivas a Pax6 (Kawakami *et al.*, 1997; de Melo *et al.*, 2003). Además, en peces se ha descrito que las células madre de la CNI son positivas a Pax6 (Otteson *et al.*, 2001; Otteson y Hitchcock, 2003).

**Islet1:** Es un factor de transcripción perteneciente a la familia de homeoproteínas que posee un dominio LIM (Dawid *et al.*, 1995; Hobert y Westphal, 2000). Fue inicialmente identificado como una proteína reguladora del gen de la insulina (Karlsson *et al.*, 1990) y está implicado en la determinación celular en algunos sistemas tisulares (Thor *et al.*, 1991; Ericson *et al.*, 1992). En retina adulta de rata la expresión de Islet1 se restringe a células bipolares, amacrinas y ganglionares (Galli-Resta *et al.*, 1997), y en pollo se considera un marcador específico de células ganglionares (Austin *et al.*, 1995). En varias especies, incluyendo el mono y humano, Islet1 se expresa en células horizontales (Haverkamp *et al.*, 2003; Shkumatava y Neumann, 2005).

**Prox1:** El gen *prox1* es el homólogo, en vertebrados, del gen *prospero* de *Drosophila*. Además de un homeodominio, la proteína posee una región conservada en el extremo C-terminal, el dominio prospero, que podría participar en la unión al ADN, o bien en interacciones entre proteínas (Burglin, 1994; Tomarev *et al.*, 1996). Este gen se ha identificado en varias especies de vertebrados y en ningún caso se han detectado genes parálogos (Oliver *et al.*, 1993; Tomarev *et al.*, 1996; Glasgow y Tomarev, 1998). El gen *prox1* se expresa por primera vez en la placoda del cristalino, y más tarde, reaparece en progenitores dispersos por el neuroepitelio (Glasgow y Tomarev, 1998; Jeffery *et al.*, 2000; Dyer *et al.*, 2003). En los progenitores retinianos de ratón, se ha comprobado que Prox1 se expresa únicamente en las fases G2/M del ciclo celular (Dyer *et al.*, 2003). En la retinogénesis se ha comprobado que Prox1 promueve la salida del ciclo celular e interviene en la diferenciación de las células de origen temprano como las células horizontales y bipolares (Cook, 2003; Dyer *et al.*, 2003). En la retina adulta, Prox1 se expresa en células

horizontales, amacrinas y bipolares (Belecky-Adams *et al.*, 1997; Dyer *et al.*, 2003; Edqvist y Hallböök, 2004).

**NeuroD:** La familia neuroD pertenece al grupo de los genes *bHLH* proneurales (denominados así por ser responsables de la génesis de progenitores neurales en el ectodermo). En general, éstas proteínas actúan como activadores transcripcionales, y para unirse al ADN forman heterodímeros con otras proteínas bHLH (Bertrand *et al.*, 2002; Chae *et al.*, 2004). El patrón de expresión de NeuroD durante la retinogénesis es bastante dinámico y variable entre las especies estudiadas (Roztocil *et al.*, 1997; Morrow *et al.*, 1999), aunque se ha observado que está relacionado con células en diferenciación, sobre todo con la diferenciación de los tipos celulares más tardíos (Ahmad *et al.*, 1998). En retina madura se ha descrito expresión de NeuroD en la CNE y la CNI de *Xenopus laevis* (Perron *et al.*, 1998), y en la CNI en el carpín (Hitchcock y Kakuk-Atkins, 2004). Estudios recientes han demostrado que NeuroD promueve la neurogénesis frente a la gliogénesis, interviniendo en la diferenciación de células amacrinas y fotorreceptores, y que es necesario para la supervivencia de los fotorreceptores. Además se ha descrito que NeuroD se expresa tanto en los precursores de bastón como en los bastones maduros (Inoue *et al.*, 2002). Una sobreexpresión de NeuroD provoca un aumento en el número de células amacrinas y de bastones, y una ausencia total de células de Müller (Morrow *et al.*, 1999). Todo ello sugiere que NeuroD promueve el desarrollo o la supervivencia de bastones y células amacrinas, a la vez que impide la formación de células de Müller (Morrow *et al.*, 1999).

**Nestina:** Es una proteína de filamentos intermedios de tipo VI que junto con los microtúbulos y microfilamentos forman el citoesqueleto. La Nestina fue identificada por primera vez en células mitóticamente activas del SNC y del SNP, que eran capaces de generar tanto neuronas como glía durante la embriogénesis temprana (Hockfield y McKay, 1985). Posteriormente se describió en células progenitoras de tejidos no neurales como el músculo, el corazón (Kachinsky *et al.*, 1995), el intestino (Rauch *et al.*, 2006) y el páncreas (Delacour *et al.*, 2004). Su función no está clara, aunque se piensa que está relacionada con la organización intracelular en procesos como la mitosis y la diferenciación celular (Goldman *et al.*, 1999).

La Nestina es un marcador ampliamente utilizado para detectar células madre y células progenitoras del SNC (Lendahl *et al.*, 1990), aunque también se expresa en glía radial (Hockfield y McKay, 1985) y astrocitos reactivos (Clarke *et al.*, 1994).

**Prominina1/CD133:** Es uno de los dos miembros de una familia de glicoproteínas denominada Prominina. Esta familia comparte una estructura general: 5 dominios transmembrana, un dominio C-terminal citoplasmático, un dominio N-terminal extracelular y varios posibles sitios de glicosilación. La Prominina1 es una glicoproteína muy conservada en la filogenia, ya que se ha descrito en *Caenorhabditis elegans* (Wilson *et al.*, 1994), *Drosophila melanogaster*, pez cebra (Corbeil *et al.*, 2001), carpín (Walsh *et al.*, 2007), ratón (Corbeil *et al.*, 1998) y humano (Yang *et al.*, 2008).

A pesar de que la Prominina1 y la Prominina2 comparten una estructura similar y se ha descrito que pueden tener funciones relacionadas, en la retina de vertebrados no se ha observado expresión de la Prominina2, únicamente de la Prominina1 (Fargeas *et al.*, 2003).

La Prominina1 se identificó inicialmente en humanos gracias a un anticuerpo que reconocía el epítipo AC133 de la proteína (Yin *et al.*, 1997). Posteriormente se describió la proteína homóloga en ratones, la Prominina (Weigmann *et al.*, 1997; Corbeil *et al.*, 2000).

Mientras que el epítipo AC133 se localiza exclusivamente en células indiferenciadas, se ha observado que el ARNm de Prominina1 no sólo se encuentra en células progenitoras sino también en tejidos adultos como el riñón, la tráquea y el páncreas (Florek *et al.*, 2005). Al anticuerpo que reconoce el epítipo AC133 se le denominó CD133. Esta discrepancia se debe a que el epítipo AC133 posee un sitio dependiente de glicosilación, y por tanto, esta variación puede provocar que el anticuerpo CD133 reconozca una variante de la Prominina1 expresada mayoritariamente en células progenitoras. Además, estudios en regulación transcripcional han demostrado que hay hasta 7 isoformas diferentes del ARNm de AC133 dependientes de tejido (Shmelkov *et al.*, 2004).

En la literatura la nomenclatura de esta proteína es confusa, ya que se utilizan indistintamente los términos: AC133, CD133, Prominina y Prominina1. En esta memoria de Tesis Doctoral utilizaremos el término Prominina1 para referirnos a la proteína genérica (se expresa tanto en células maduras como inmaduras) y CD133 para la variante de la proteína que se expresa mayoritariamente en células progenitoras.

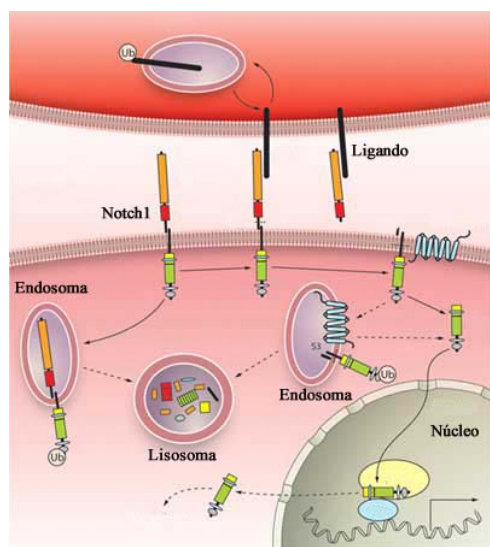
La función de la Prominina1 es todavía desconocida, ya que no se conocen ni sus ligandos ni las posibles interacciones con moléculas intracelulares. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que en células maduras se localiza en proyecciones o protrusiones de membrana asociándose con el colesterol (Corbeil *et al.*, 1999), como por ejemplo en los segmentos externos de los bastones, y parece que es necesaria para la estabilidad de la membrana. En humanos se ha descrito que una mutación en la Prominina1 provoca una

## Introducción

degeneración retiniana autosómica recesiva (Maw *et al.*, 2000). La delección de un único nucleótido provoca la pérdida de la mitad del segundo bucle extracelular de la proteína, lo que impide su transporte hacia la membrana. La ausencia de la Prominina1 impide la biogénesis de los discos en los bastones, lo que provoca la degeneración retiniana. En células progenitoras, esta proteína transmembrana podría estar involucrada en la polaridad celular, la migración y la interacción de las células progenitoras con otras células o con la matriz celular (Shmelkov *et al.*, 2005).

La Prominina1 está muy conservada en la escala filogenética ya que se ha descrito en *C. elegans*, *Drosophila* y pez cebra (Shmelkov *et al.*, 2004). Estudios *in vitro* han demostrado que las neuroesferas positivas a CD133 no solo son capaces de autorrenovarse, sino que también poseen pluripotencialidad, ya que se diferencian tanto a estirpe neural como glial (Uchida *et al.*, 2000). Por todo ello, el epítipo AC133 es un importante marcador para identificar diferentes poblaciones de progenitores neurales.

**Notch1:** Pertenece a una familia de receptores transmembrana que funcionan como factores de transcripción y que están muy conservados en la evolución. En vertebrados se han descrito cuatro tipos de receptores Notch diferentes: Notch1, Notch2, Notch3 y Notch4. Los receptores Notch están compuestos por un dominio extracelular encargado de interaccionar con los ligandos, un único dominio transmembrana y un dominio intracelular (Brou *et al.*, 2000). La familia de receptores Notch se activa por ligandos transmembrana (Delta y Serrata) que se localizan en células vecinas. Cuando el receptor Notch es activado por un ligando, se producen una serie de procesos proteolíticos, que tienen como resultado la



**Fig. 13:** Esquema de la activación de Notch1. Modificado de [www.scienceblogs.com](http://www.scienceblogs.com).

liberación del dominio intracelular de Notch, que actúa como un factor de transcripción dirigiéndose al núcleo (Fig. 13) (Yaron *et al.*, 2006). Estudios realizados tanto en invertebrados como en vertebrados han demostrado que la función de Notch1 varía considerablemente, ya que según el grado de diferenciación y el tipo celular puede realizar funciones totalmente opuestas (Bray, 1998; Perron y Harris, 2000). En la neurogénesis de vertebrados se ha descrito que Notch1 y su ligando Delta1 están implicados en el mantenimiento de precursores indiferenciados mediante la inhibición

de la diferenciación celular (Chitnis *et al.*, 1995; Henrique *et al.*, 1995, 1997; Perron y Harris, 2000). Sin embargo, también se ha visto que la activación de Notch1 puede favorecer la diferenciación de determinados tipos celulares.

En la retina, la activación de Notch 1 en precursores postmitóticos favorece la diferenciación de los mismos a células de Müller (Dorsky *et al.*, 1995; Furukawa *et al.*, 2000; Hojo *et al.*, 2000; Chambers *et al.*, 2001; Scheer *et al.*, 2001; Gaiano y Fishell, 2002). Sin embargo, en el NO (Wang *et al.*, 1998) y la médula espinal (Genoud *et al.*, 2002) la activación de Notch1 inhibe la gliogénesis.

## 1.4 Posibles aplicaciones de los progenitores retinianos en terapia celular

La retinosis pigmentaria, la retinopatía diabética y la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) son los principales subtipos de degeneraciones retinianas que provocan ceguera debido a la pérdida de los fotorreceptores. Uno de cada tres individuos mayores de 75 años tiene DMAE y uno de cada tres mil individuos sufre retinosis pigmentaria. A pesar de la alta incidencia de estas enfermedades degenerativas solo un tipo de DMAE húmeda tiene tratamiento, el resto de los subtipos no lo tienen. Una de las terapias más utilizadas para tratar estas enfermedades han sido los trasplantes. Se han realizado trasplantes tanto con explantes de retinas intactas (Radtke *et al.*, 2004) como con capas aisladas (Silverman y Hughes, 1989), ya sean de tejido adulto o embrionario. El grado de recuperación obtenido no está muy claro, ya que parece que sólo tienen un efecto neuroprotector retardando la degeneración de los fotorreceptores. Otra desventaja en este tipo de terapia es que se requiere gran cantidad de tejido, lo que dificultaría la posibilidad de realizar autotrasplantes en humanos.

El descubrimiento de células progenitoras en la retina adulta de mamíferos ha abierto la posibilidad de analizar nuevas estrategias terapéuticas orientadas a reponer las células que se han perdido. Estos nuevos datos han hecho que muchos investigadores se replanteen las terapias celulares utilizadas hasta el momento, ya que dichas células permitirían realizar trasplantes mas precisos que repusieran específicamente los tipos celulares degenerados. Se ha descrito que el grado de diferenciación de las células a trasplantar es un factor

## Introducción

---

determinante (Maclaren *et al.*, 2006), ya que su integración en la retina degenerativa dependerá de su capacidad para migrar y diferenciarse a un tipo celular en concreto. Por ello, es muy importante conocer la potencialidad de las células progenitoras y qué factores son necesarios para obtener el grado de diferenciación óptimo para el trasplante.

Este nuevo enfoque genera la necesidad de abordar la caracterización de los progenitores desde otro punto de vista, ya que los datos obtenidos en los estudios *in vivo* son insuficientes a la hora de plantear nuevas terapias celulares. Todo ello ha provocado que además de su caracterización *in vivo*, los estudios *in vitro* se hayan convertido en una herramienta imprescindible para caracterizar los progenitores retinianos.



# Justificación y Objetivos

---

La pérdida de los fotorreceptores es una de las principales causas de ceguera en humanos, y actualmente no existe ningún remedio eficaz para detener la degeneración o para reponer los fotorreceptores perdidos. Una de las terapias celulares más prometedoras para el tratamiento de las enfermedades degenerativas retinianas es el trasplante de progenitores retinianos. Las células retinianas que por el momento han dado los mejores resultados han sido los progenitores de bastón embrionarios (Maclaren *et al.*, 2006). Se ha demostrado que el trasplante de estas células para reponer los fotorreceptores perdidos es efectivo, ya que, no solo se integran en la retina sino que además mejoran la función visual (Maclaren *et al.*, 2006). El grado de madurez de los progenitores de bastón es un factor limitante para la integración de estas células en la retina dañada. Únicamente los progenitores de bastón postmitóticos son capaces de migrar y diferenciarse a bastón. Por ello, la caracterización de los progenitores de bastón es fundamental para su posible uso terapéutico en enfermedades degenerativas retinianas.

En la mayoría de los vertebrados la formación de nuevos fotorreceptores se limita a un periodo concreto de la retinogénesis. La utilización de modelos experimentales clásicos, como son la rata o el ratón, aunque permitiría caracterizar los progenitores de bastón durante la embriogénesis, no aportaría información sobre el comportamiento de estas células en retina madura.

En teleósteos se ha descrito la existencia de progenitores de bastón durante toda la vida adulta del animal (Johns, 1982; Raymond, 1991). En este grupo de vertebrados la formación de bastones no se produce durante la embriogénesis, sino en etapas adultas. En un ejemplar adulto podemos encontrar progenitores del linaje de bastón en diferentes grados de diferenciación. Por tanto, la retina adulta de teleósteos es un modelo ideal para investigar la potencialidad y las limitaciones del uso de células progenitoras en la sustitución de fotorreceptores dañados. La regulación de la proliferación de los progenitores de bastón, su patrón de migración y su diferenciación a fotorreceptores funcionales son datos imprescindibles para el desarrollo de las terapias celulares frente a las enfermedades degenerativas retinianas (Bessant *et al.*, 2001; Aramant y Seiler, 2002).

En la presente Tesis Doctoral nos hemos planteado la caracterización de los progenitores retinianos desde dos puntos de vista. Por un lado hemos estudiado la expresión de diferentes marcadores en la retina adulta para determinar el patrón de diferenciación y de migración del linaje de bastón, y por otro hemos abordado su aislamiento *in vitro*. Actualmente, no existe ningún protocolo para la caracterización de progenitores de bastón, y además en la

## *Justificación y Objetivos*

---

literatura apenas existen datos sobre cultivos primarios en peces. Por ello, hemos puesto a punto un método para aislar y cultivar progenitores de bastón procedentes de retina adulta.

Los objetivos concretos de esta Tesis Doctoral han sido:

- Localizar e identificar los progenitores de bastón en la retina adulta del carpín.
- Caracterizar el patrón de expresión de diferentes marcadores neurales en los progenitores de bastón, y analizar su variación durante su migración a través de la retina. Los marcadores utilizados han sido: Pax6, Prox1, Islet1, NeuroD, Notch1, Nestina y CD133.
- Poner a punto un protocolo que permita establecer un cultivo primario de progenitores de bastón.

# Material y Métodos

## 3.1 Animal de experimentación

El animal de experimentación empleado para la realización de esta Tesis Doctoral ha sido el carpín dorado, *Carassius auratus* (L., 1758) (Fig. 14). Hemos utilizado ejemplares adultos de 7,5 a 9 cm. de longitud, proporcionados por Hobby Aquarium, Salamanca.



**Fig. 14:** Carpín dorado, *Carassius auratus*.

Los animales se mantuvieron en peceras de 50 litros de capacidad a una temperatura de 20°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), con aireación forzada y recirculación continua de agua, con fotoperiodo controlado, ajustado en ciclos de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. En todos los casos, los estudios se realizaron tras un periodo de adaptación mínimo de una semana.

Tras la adaptación, y dependiendo de la técnica a realizar, se sometió a los ejemplares a diferentes pretratamientos que describiremos en el siguiente apartado. Al finalizar los pretratamientos, los animales se anestesiaron sumergiéndolos en una solución de metanosulfonato de triclaína (MS-222, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EE.UU.) a una concentración de 0,3 g/l, y se sacrificaron mediante decapitación.

Todos los protocolos de mantenimiento, manipulación y sacrificio de los animales se llevaron a cabo cumpliendo las directrices del Consejo de las Comunidades Europeas (86/609/EEC y 2003/65/EC) y de la legislación española (RD 1201/2005 de 10 de octubre, BOE de 21 de octubre de 2005) vigentes para el uso y cuidado de animales de experimentación, y bajo la supervisión del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.

## 3.2 Pretratamiento de los animales

**3.2.1 Tratamiento antiséptico:** Para minimizar las posibles infecciones en los ejemplares se realizó un tratamiento antiséptico con colorantes orgánicos. Los animales se sumergieron durante una semana en tanques de 25 litros de capacidad a los que se añadió: azul de metileno (4 gotas de una solución al 5%), verde malaquita (1mg/10 litros) y cristal violeta (1mg/15 litros). El azul de metileno es un colorante perteneciente al grupo de las anilinas, ampliamente utilizado en acuicultura para eliminar infecciones bacterianas,

fúngicas y parasitarias. El verde malaquita se utiliza principalmente contra parásitos protozoos de agua dulce, mientras que el cristal violeta es un potente antifúngico. Con la combinación de estos tres agentes conseguimos disminuir tanto la infección ocular como la posible contaminación de las retinas durante la extracción previa al cultivo.

**3.2.2 Inyección de BrdU:** Los animales fueron anestesiados con MS222 y se les inyectaron 0,2 µg de BrdU (Sigma) disueltos en suero fisiológico. Las inyecciones se

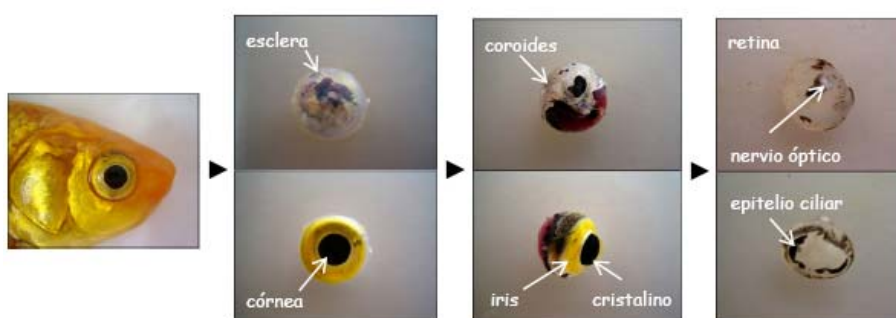


**Fig. 15:** Inyección de BrdU en la zona urogenital del animal.

realizaron en la región anterior a la abertura urogenital para evitar daños en órganos vitales (Fig. 15). Se realizaron cada 48 horas, hasta un total de cuatro, y los animales fueron sacrificados al séptimo día. Desde la primera inyección y hasta su sacrificio los animales se mantuvieron en un tanque con azul de metileno, verde malaquita y cristal violeta para evitar posibles infecciones.

## 3.3 Extracción de los ojos y la retina

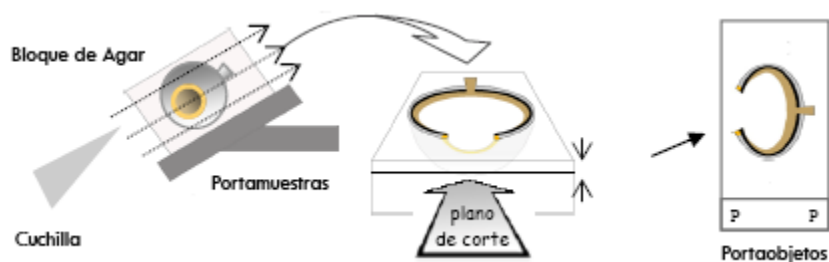
Inmediatamente después de sacrificar al animal, se procedió a la extracción de los ojos cortando la musculatura extraocular y el nervio óptico. Cuando el experimento requería el aislamiento de la retina, se procedió a la separación de las capas más externas del ojo. Se recortó la esclera desde la mitad del polo posterior hasta el límite con la córnea, separando entonces suavemente el iris de la córnea. A continuación, se realizó la misma operación con la coroides. Finalmente, se cortaron las fibras que unen el cristalino al cuerpo ciliar, y se cortó la porción restante de nervio óptico, coroides y esclera (Fig. 16).



**Fig. 16:** Secuencia de fotografías tomadas durante el aislamiento de la retina.

### 3.4 Procesamiento histológico

Los ojos fueron fijados por inmersión en una mezcla constituida por paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1M, pH 7.4 (TF) durante cuatro horas a temperatura ambiente. En el caso del tejido que se iba a utilizar en hibridación *in situ* se mantuvieron los ojos en metanol durante 72 horas a -20°C. Tras sucesivos lavados en TF se preparó el tejido para su posterior corte en un criostato. Los ojos se crioprotegieron en una solución de sacarosa al 30% (P/V) en TF durante 12 horas a temperatura ambiente y se encastraron en un medio constituido por agar al 1.5% y sacarosa al 5% (P/V) en TF. Los bloques con las muestras fueron mantenidos en una solución de sacarosa al 30% (P/V) en TF durante al menos 48 horas a 4°C. Una vez crioprotegidos, los bloques se congelaron con nitrógeno líquido y se cortaron en un criostato (Leica Jung CM3000, Nussloch, Alemania) a una temperatura de -24°C. Se realizaron secciones horizontales de 12 µm de espesor que fueron recogidas en portaobjetos doblemente gelatinizados (Fig. 17). Debido a las altas temperaturas utilizadas durante la hibridación *in situ*, las secciones para dicha técnica se recogieron en portas *superfrost* (Thermo Scientific, Braunschweig, Alemania). Los portaobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente y se almacenaron a -30°C hasta su posterior procesamiento. En el caso del procesamiento para hibridación *in situ* todo el material utilizado era libre de ARNasas.



**Fig. 17:** Esquema del proceso de corte del tejido.

### 3.5 Técnicas inmunohistoquímicas

Para poner de manifiesto la presencia de diferentes marcadores en la retina adulta de carpín hemos utilizado la técnica inmunohistoquímica de la avidina-biotina-peroxidasa (ABC) en el caso de los marcajes simples, y un método de inmunofluorescencia para analizar las posibles colocalizaciones de distintos marcadores.

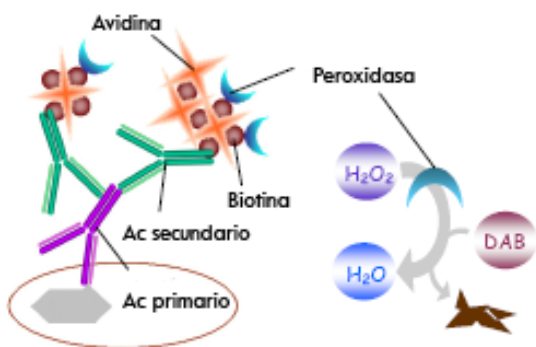
### 3.5.1 Inmunohistoquímica en secciones

Las secciones se descongelaron a temperatura ambiente durante una hora y se lavaron en TF para rehidratar el tejido, 3x10 minutos en agitación.

La inmunohistoquímica contra BrdU precisa un tratamiento previo para desnaturalizar el ADN. Las secciones procedentes de animales inyectados con BrdU se incubaron a 37°C con HCl 2 N durante 30 minutos y se lavaron posteriormente 3x10 minutos en agitación con tampón borato 0,1 M, pH 8,5.

#### Método avidina-biotina-peroxidasa (Fig. 18)

La actividad peroxidasa endógena se eliminó tras la incubación de las secciones con  $H_2O_2$  al 0,2 % en TF durante 5 minutos. Tras lavar de nuevo con TF se realizó una preincubación con suero no inmune (Sigma) al 5 % y Triton X-100 (Probus S.A.) al 0,02 % en TF durante 1 hora a temperatura ambiente. En cada caso se utilizó suero procedente de la especie en que se había obtenido el anticuerpo secundario. Con este procedimiento conseguimos facilitar la penetración de los anticuerpos y, además, reducir las uniones inespecíficas de los mismos al tejido. A continuación las secciones se incubaron con el medio indicado anteriormente al que añadimos el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 1), en una cámara húmeda durante 2 días a 4°C. Una vez finalizada la incubación, los cortes



**Fig. 18:** Esquema de la técnica inmunohistoquímica realizada por el método ABC.

se lavaron con TF y se mantuvieron durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda con el medio de incubación y el anticuerpo secundario biotinilado apropiado (Tabla 1). En todos los casos, la dilución del anticuerpo secundario fue de 1:250. Tras lavar el exceso de anticuerpo secundario se incubó el tejido durante 1 hora con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (kit Elite ABC, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EE.UU.). El complejo

ABC se preparó a una concentración de 1:250 media hora antes de su utilización. Tras lavar las secciones en TF, se realizó un lavado de 5 minutos en tampón Tris-HCl 0.1 M, pH 7.6. La reacción se reveló mediante el empleo del cromógeno 3-3' diaminobencidina (DAB) al 0.025% (Sigma) y  $H_2O_2$  (0.0033%) en tampón Tris-HCl 0.2 M, pH 7.6. La reacción se controló bajo el microscopio y se detuvo mediante lavados sucesivos con tampón Tris-HCl.



Finalmente, las secciones se deshidrataron en una batería de alcoholes de graduación creciente, se aclararon en xileno, y se montaron con Entellan (Merck, Darmstadt, Alemania).

### Método inmunofluorescente (Fig. 19)

Para evitar la autofluorescencia del tejido añadimos a todos los medios de incubación gelatina de pez (Sigma) al 0,4%. La preincubación con el suero no inmune se realizó igual



**Fig. 19:** Esquema de la técnica inmunohistoquímica fluorescente.

que en el método ABC. A continuación, se llevó a cabo una incubación con dos anticuerpos primarios obtenidos en especies diferentes para evitar interferencias. Las secciones se mantuvieron durante 48 horas en una cámara húmeda a 4°C. Tras un lavado en TF, las secciones se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios fluorescentes (Tabla 1) diluidos 1:250 en el medio de incubación, durante 1 hora, a temperatura ambiente y en oscuridad.

En los casos en los que hubo que amplificar la señal fluorescente, como por ejemplo para poner de manifiesto el factor NeuroD, utilizamos un anticuerpo secundario biotinilado y, a continuación se añadió una molécula con gran afinidad por la biotina, la estreptavidina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) unida al fluorocromo correspondiente a una concentración de 1:750 durante 30 minutos. Tras realizar los controles negativos rutinarios, observamos marcaje inespecífico de la estreptavidina. Ello se debe a que dicha molécula además de unirse al anticuerpo secundario biotinilado, se une de forma inespecífica a las células de Müller. Por ello, realizamos un tratamiento previo a la incubación del anticuerpo primario para evitar las uniones inespecíficas. El tejido se incubó con avidina (Vector) a una concentración de 1:1000 disuelta en TF durante una noche a temperatura ambiente. Debido a que la avidina tiene gran afinidad por la biotina, conseguimos que esta molécula bloquee cualquier posible unión de la estreptavidina al tejido.

Para marcar los núcleos de todas las células se realizó una incubación de 7 minutos en oscuridad, con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma) a 1:10<sup>4</sup>, o bien con ioduro de propidio (IP; Sigma) a 1:2000, en TF. Por último, las secciones se lavaron con TF y se montaron con medio comercial Fluoromont<sup>®</sup> (Sigma).

P R I M A R I O S	Antígeno	Anticuerpo	Dilución de uso	Casa comercial
	BrdU	IgG de rata, monoclonal	1:5000	Accurate
	CD133	IgG de conejo, policlonal	1:500	Miltenyi
	Nestina	IgG de conejo, policlonal	1:500	Abcam
	Islet1	IgG de conejo, policlonal	1:500	Abcam
	NeuroD	IgG de conejo, policlonal	1:500	Abcam
	Pax6	IgG de conejo, policlonal	1:500	Covance
	Prox1	IgG de conejo, policlonal	1:1000	Covance

S E C U N D A R I O S	Método	Antígeno	Anticuerpo	Conjugado con	Casa comercial
	ABC	IgG de rata	IgG de cabra	biotina	Vector
		IgG de conejo	IgG de cabra	biotina	Vector
	FLUORESCEN- CIA	IgG de rata	IgG de cabra	Cy2	Jackson
		IgG de conejo	IgG de cabra	Cy3	Jackson

**Tabla 1:** Relación de anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

### 3.5.2 Controles de la técnica inmunohistoquímica

Se han realizado los siguientes controles para comprobar la especificidad de la técnicas inmunohistoquímicas:

- Omisión de los anticuerpos primarios para detectar uniones inespecíficas de los anticuerpos secundarios.
- Eliminación del anticuerpo secundario biotinilado, para confirmar que no había unión del complejo ABC al tejido.
- Ausencia del complejo ABC, para comprobar que el marcaje no se debía a una actividad peroxidasa endógena.
- Omisión del anticuerpo secundario fluorescente, para comprobar que el marcaje no se debía a una autofluorescencia del tejido.
- En el caso de los dobles marcajes, incubación con uno de los dos anticuerpos primarios y adición del anticuerpo secundario correspondiente al anticuerpo primario omitido para detectar inmunorreactividad cruzada.

En ninguno de los casos detectamos marcaje positivo que se debiera a uniones inespecíficas.

## 3.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) Western Blot

Para demostrar la especificidad de los anticuerpos se realizó una electroforesis SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes (Tabla 2).

Todos los anticuerpos utilizados, a excepción del anticuerpo monoclonal contra BrdU, eran policlonales y obtenidos en conejo. El anticuerpo contra BrdU no fue testado por Western Blot ya que reconoce una molécula sintética comercial.

Para la realización de la electroforesis se utilizaron 2 retinas completas por gel de poliacrilamida. Llevamos a cabo la extracción de proteínas utilizando el RIPA<sup>®</sup> Lysis Buffer 1X (Santa Cruz Biotechnology, Inc.<sup>®</sup>, Santa Cruz, CA, EE.UU) según las especificaciones del producto. Después se homogeneizaron mecánicamente las retinas.

	Peso Molecular	Nº de aminoácidos	Número de acceso
<b>Pax6</b> <sub>(1)</sub>	48 kDa	437	P26630
<b>Prox1</b> <sub>(2)</sub>	83 kDa	739	A2TE38
<b>NeuroD</b> <sub>(1)</sub>	39 kDa	350	O42202
<b>Islet1</b> <sub>(1)</sub>	39 kDa	349	P53405
<b>CD133</b> <sub>(1)</sub>	91 kDa	826	Q9W735
<b>Nestina</b> <sub>(3)</sub>	207 kDa	1864	Q6P5H2

**Tabla 2:** Datos moleculares de los marcadores utilizados. (1) pez cebra. (2) carpín. (3) ratón ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)).

Para la realización de la electroforesis se siguió el siguiente protocolo:

1- Se añadieron 60 µl de tampón de carga (2% dodecil sulfato sódico [SDS], 10% glicerol, 5% β-mercaptoetanol, 62,5 mM de Tris-HCl, pH 6,8 y 0,25% azul de homofenol) al tejido disgregado.

2- Se calentó la muestra a 90 °C durante 5 minutos para desnaturizar el ADN, y

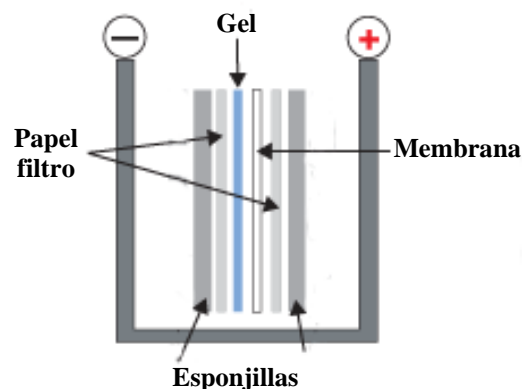
después se puso en hielo para impedir la renaturalización.

3- Para la electroforesis se utilizaron dos geles. El primero es el gel separador, por el que migran las proteínas en función de su peso molecular, y está compuesto por 30%-0,3% Acril-Bisacrilamida, 1/5 solución TGGs (1 M de Tris-HCl, 0,5 M de glicina y 25% glicerol), 20% SDS, 1/100 persulfato amónico (APS) y 1/2000 N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), en agua ultrapura. Se dejó polimerizar durante 30 minutos.

4- El segundo gel utilizado es el encargado de acumular todas las proteínas para que migren a la vez. Está compuesto por 30%-0,3% Acril-Bisacrilamida, 1/5 solución TEG (0,35 M Tris-HCl a pH 6,7, 20 mM etilendiamina, EDTA y 25% glicerol), 1/50 SDS, 1/100 APS y 1/1000 TEMED. Se añadió sobre el gel separador y se dejó polimerizar durante una hora tras poner el peine que permite la formación de los pocillos de carga.

5- El peine utilizado formaba dos pocillos, uno más pequeño para el marcador de peso molecular, y el otro más grande en el que añadimos las dos retinas disgregadas. Utilizamos un marcador de peso molecular con proteínas estándar SDS-PAGE de pesos moleculares conocidos (Invitrogen).

6- El gel se dispuso en una cubeta mini-PROTEAN<sup>®</sup> con una fuente de alimentación



**Fig. 20:** Esquema del sándwich del Western Blot ([www.bme.gatech.edu](http://www.bme.gatech.edu)).

PowerPac Basic<sup>™</sup> (Bio Rad). La cubeta de electroforesis se llenó con tampón de migración (250 mM de Tris-HCl a pH 8.3, 1.92 M de glicina y 1% SDS). El voltaje utilizado en la migración fue de 70 V.

7- Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa mediante la aplicación de un campo eléctrico. Se colocó el gel en el molde del sándwich (Fig. 20), que además contenía papeles de filtro, esponjillas y membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences, Little Chalfon, Reino Unido).

8- Se dispuso el sándwich en una cubeta (Mini Trans-Blot, de Bio Rad) con tampón de transferencia (250 mM de Tris-HCl a pH 8.3, 1.92 M glicina y 20% de metanol en agua milliQ). La transferencia se realizó a 4°C durante 1 hora a 100V.

9- La membrana de nitrocelulosa se lavó 3 veces durante 10 minutos cada lavado en

TBS-Tween 20 (TBST: 1 M de Tris-HCl a pH 7.5, 5 M de NaCl, 0.1% Tween 20 (Sigma) en agua miliQ), a temperatura ambiente en agitación.

10- Preincubación con leche desnatada en polvo al 5% en TBST 0.1%, durante 1h.

11- Tres lavados de 10 minutos cada uno en TBST.

12- La membrana se cortó en seis tiras perpendiculares al frente de migración y en cada una de ellas se incubó independientemente los 6 anticuerpos primarios. La incubación se realizó en TBST a una concentración de 1/5000 para los anticuerpos contra Pax6, Islet1, NeuroD, CD133 y Nestina, y de 1/10000 para Prox1 durante 12 horas a 4°C en agitación.

13- Tres lavados de 10 minutos cada uno en TBST a temperatura ambiente y agitación.

14- Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo hecho en cabra (Vector) a una concentración 1/1000, durante 1 hora a temperatura ambiente.

15- Tres lavados de 10 minutos cada uno en TBST.

16- Revelado de la membrana utilizando el método ABC (ver apartado 3.5.1).

### 3.7 Técnica de hibridación *in situ*

Para poner de manifiesto la presencia de un determinado ARNm en la retina adulta de carpín, hemos empleado la técnica de hibridación *in situ* revelada mediante el sistema de la digoxigenina y antisuero anti-digoxigenina asociado con fosfatasa alcalina. Las ribosondas son secuencias de ARN antisentido de 200 a 300 nucleótidos de longitud, en las cuales los uracilos llevan unida una partícula de digoxigenina con el fin de que sean reconocidas posteriormente por el anticuerpo. El ADN correspondiente a la ribsonda se encuentra insertado en el plásmido pCaSpeR. Para linealizar el plásmido, se cortó con una enzima de restricción y posteriormente se utilizó una polimerasa para sintetizar la ribsonda. Las ribosondas de Notch1 y NeuroD fueron amablemente cedidas por el Prof. Stephen Wilson del University College London (Londres, Reino Unido).

Todas las soluciones y el material de plástico fueron previamente autoclavados; y en el caso del vidrio, horneado una noche a 200°C con el fin de eliminar las ARNasas. El protocolo utilizado fue el siguiente:

1- Rehidratación de las secciones en una batería de alcoholes de graduación decreciente (100°, 96°, 70° y 50°), acabando con dos lavados en tampón citrato sódico salino (SSC) (2x).

## Material y Métodos

---

2– Incubar las secciones 5 minutos en el tampón de la proteinasa K (PK), compuesto por 0.1M Tris pH 8, 50 mM de EDTA y 10 mg/ml de PK (Sigma).

3– Lavado de 3 minutos en una solución con trietanolamina (TEA) 0.1 M pH 8 y después otro lavado de 10 minutos en TEA con 2.5% de ácido acético anhidro.

4– Dos lavados de un minuto en tampón SSC (2x) y deshidratación de las secciones en una batería de etanol de graduación creciente (50°, 70°, 96° y 100°). Dejar secar las secciones a temperatura ambiente durante al menos una hora.

5– Preincubación de las secciones durante dos horas a 65°C en la solución de hibridación, según el protocolo de Barthel y Raymond (1993).

6– Incubación de las secciones en la solución de hibridación con la ribosonda correspondiente durante toda la noche a 65°C. Para evitar la evaporación del medio de hibridación las secciones se cubrieron con un cubreobjetos.

7– Para retirar el cubreobjetos se realizaron dos lavados con SSC (2x) a temperatura ambiente.

8– Lavado de 30 minutos en 50% de formamida y 50% de SSC (2x) a 65°C.

9– Dos lavados en SSC (2X) a 37°C durante 10 minutos cada uno.

10– Lavado en una solución compuesta por Tris-HCl 1M pH 7.5, NaCl 5M y EDTA 0.5M a 37°C durante 30 minutos, y posteriormente, otro lavado a 65°C.

11– Varios lavados durante 2 ó 3 horas en SSC (2X) con 0.5% de Triton X-100 y 2% de Blocking Reagent (Roche).

12– Dos lavados de 5 minutos en tampón málico.

13– Preincubación de las secciones 2 horas en tampón málico, con 0.3% de Triton X-100 y 1% de Blocking Reagent.

14– Incubación de las secciones en la misma solución anterior más el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1:3000, durante toda la noche a 4°C.

15– Dos lavados de 10 minutos en tampón málico.

16– Tres lavados de 10 minutos cada uno en la solución de revelado (Tris-HCl 1M pH 9.5, MgCl 1 M, NaCl 4M, Triton-X100 al 10%).

17– Revelado de la hibridación *in situ* utilizando NBT (Roche) y BCIP (Roche). El revelado se siguió bajo el microscopio y se detuvo la reacción utilizando tampón málico.

18– Fijación de las secciones durante 20 minutos con paraformaldehído 4%.

19– Varios lavados en TF.

20– Detección de BrdU mediante el método ABC descrito en apartados anteriores.

### 3.7.1 Controles de la hibridación *in situ*

Para comprobar la especificidad de dicha técnica realizamos los siguientes controles negativos:

- Omisión de la ribsonda correspondiente, para comprobar que el anticuerpo anti-digoxigenina se une específicamente.
- Eliminación del anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina.
- Realización de la hibridación con las ribosondas sentido.

En ninguno de los controles se observó marcaje.

## 3.8 Cultivos primarios de células progenitoras de bastón

### 3.8.1 Protocolo del cultivo primario

Todos los ejemplares utilizados para los cultivos celulares fueron sometidos a un pretratamiento con colorantes (descrito en el apartado 2.2.1) durante una semana. Durante las doce horas previas al cultivo los peces fueron mantenidos en completa oscuridad para facilitar el aislamiento de la retina.

Los animales se anestesiaron siguiendo el protocolo descrito en apartados anteriores, y se extrajeron los ojos cortando la musculatura extraorbital y el nervio óptico. Para el aislamiento de las retinas utilizamos un medio de cultivo no selectivo con L-glutamina denominado Leibovitz's L-15 (Invitrogen, CA, EE.UU.) al que añadimos tres antibióticos, penicilina-estreptomicina (Invitrogen) y ciprofloxacino (Sigma), y un antimicótico, la anfotericina B (Sigma). Las retinas se aislaron de manera individual en placas de 60 mm y tras recortar la ZPG se mantuvieron en Leibovitz's L-15 hasta terminar todo el proceso de extracción. Se realizaron tres lavados para eliminar todo el humor vítreo y se procedió a disgregar el tejido. La disociación del tejido se realizó combinando disgregación enzimática y mecánica. Tras los lavados, las retinas se disgregaron mecánicamente con una pipeta y se incubaron en un baño a 37°C con una mezcla enzimática denominada PDD durante 10 minutos. La solución PDD contiene 0.01% de papaína (Sigma), 0.1% de dispasa II (Roche) y 0.01% de DNasa I (Roche) disuelto en solución de Hank's (Invitrogen).

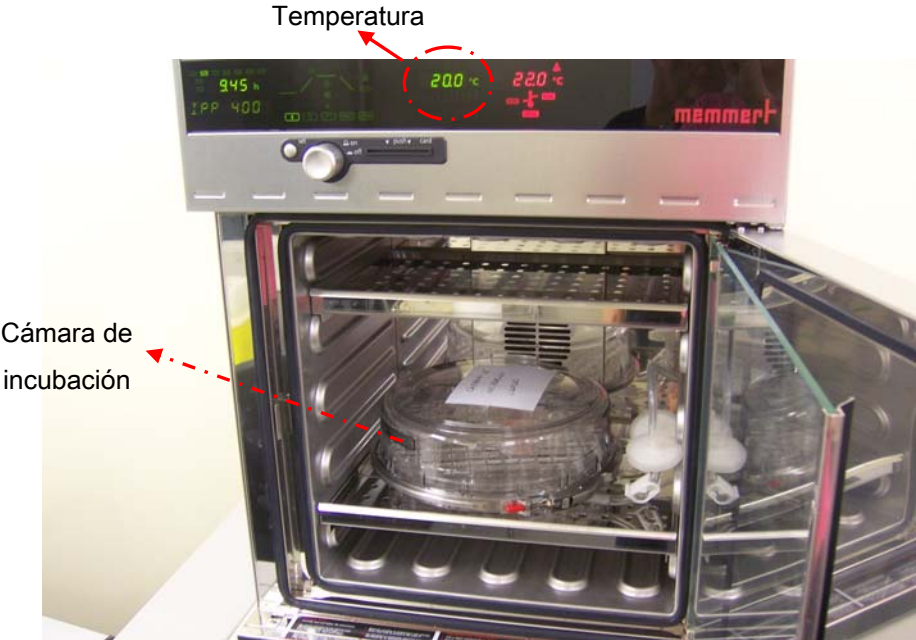
# Material y Métodos

Para eliminar las enzimas de la solución celular, la muestra se centrifugó 3 veces a una velocidad de 120 G, durante 5 minutos a una temperatura de 4°C. Todas las centrifugaciones descritas en este protocolo se realizaron según los mismos parámetros. El *pellet* obtenido se resuspendió en medio de cultivo Neurobasal A suplementado con dos factores de crecimiento, EGF (Sigma) y FGF (Sigma), un suplemento comercial denominado B27 (Invitrogen), L-glutamina (Invitrogen), heparina (Sigma), anfotericina B (Sigma) y varios antibióticos de amplio espectro (Tabla 3). Por último, las células se sembraron en multiplacas de 6 pocillos.

NEUROBASAL A suplementado		
Factores de crecimiento	EGF	20 ng/ml
	FGF	
Antibióticos	Penicilina	100 U/ml
	Estreptomicina	100 U/ml
	Ciprofloxacino	4 µg/ml
Antifúngico	Anfotericina B	100 µg/ml
Suplemento comercial	B27	20 µl/ml
L-glutamina		200 mM
Heparina		2 µg/ml

**Tabla 3:** Composición del medio de cultivo Neurobasal A suplementado.

Todo el material quirúrgico utilizado para la enucleación y aislamiento de las retinas fue esterilizado previamente. Para mantener las condiciones de cultivo óptimas, las placas se introdujeron en una cámara de incubación que contenía una atmósfera compuesta de 5% de CO<sub>2</sub>, 25% de O<sub>2</sub> y 75% de N<sub>2</sub>. La cámara se mantuvo en una estufa refrigerada a 20°C (Fig. 21).



**Fig. 21:** Fotografía de la cámara de incubación y de la estufa utilizadas para mantener los cultivos primarios.



Cada 3 ó 4 días se realizaron cambios del medio de cultivo para renovar los factores de crecimiento. Se recogía el medio de la placa, se centrifugaba y resuspendía el *pellet* con medio Neurobasal A suplementado fresco. Por último se sembraba en una placa de 6 pocillos.

**Método de exclusión del azul tripán:** Se emplea para determinar la viabilidad celular de un cultivo. El azul tripán (Sigma) es un colorante vital que se introduce en las células que presentan roturas en la membrana, por lo tanto, aquellas células que estén teñidas de color azul se consideran inviables. Para teñir las células se mezclaron 0,1 ml de la suspensión celular y 0.9 ml de azul tripán al 4%. Posteriormente observamos la solución bajo el microscopio para detectar las células marcadas en azul.

**Prueba de antibióticos:** Para eliminar la contaminación presente en el cultivo celular utilizamos tres antibióticos de amplio espectro (Tabla 4): vancomicina, gentamicina y ciprofloxacino (Sigma). Los antibióticos se añadieron al medio de cultivo Neurobasal A suplementado desde el primer día de cultivo y se observó la evolución de la contaminación hasta tres semanas después. Debido a que en el cultivo teníamos tanto bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, utilizamos no solo los tres antibióticos de manera independiente, sino también la gentamicina y la vancomicina de forma combinada. Además de comprobar la efectividad de los antibióticos, observamos si la tasa de proliferación y la supervivencia celular se veían afectadas.

	Concentración	Espectro antimicrobiano	Casa comercial
<b>Vancomicina</b>	20 µg/ml	Bacterias Gram-positivas	Sigma
<b>Gentamicina</b>	5 µg/ml	Bacterias Gram-negativas	Sigma
<b>Ciprofloxacino</b>	4 µg/ml	Bacterias Gram-negativas, Gram-positivas	Sigma

**Tabla 4:** Relación de antibióticos utilizados.

**Adhesión celular al sustrato:** Cuando el cultivo celular cumplía tres semanas disgregamos las neuroesferas y las sembramos en cubreobjetos pretratados para favorecer la adhesión y la diferenciación celular. En primer lugar los cubreobjetos se incubaron con ácido clorhídrico 1 M a 65°C durante toda una noche. Con este tratamiento conseguimos que los cubreobjetos sean más porosos. Se lavaron con agua destilada estéril y se dejaron secar

durante 30 minutos. A continuación se cubrieron con una solución con poliornitina (Sigma) a una concentración de 0,1 mg/ml y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada y se dejaron secar durante 30 minutos

Tras incubar los cubreobjetos con poliornitina se realizaron dos protocolos diferentes: tratamiento con laminina (Sigma) o con fibronectina (Sigma). En el caso de la laminina se incubaron los cubreobjetos a una concentración de 5 µg/ml durante dos horas a 37°C. La fibronectina se utilizó a una concentración de 1 µg/ml y se dejó incubar durante 48 horas a temperatura ambiente en oscuridad. En ambos casos, tras la incubación hay que retirar la solución y sin lavar, se siembran las células progenitoras.

### 3.9 Análisis de imagen

Se obtuvieron imágenes de las distintas preparaciones utilizando un fotomicroscopio (Olympus Provis AX70, Japón) equipado con campo claro y epifluorescencia, conectado a una cámara digital (Olympus DP70). Para obtener las imágenes de los cultivos primarios se utilizó un microscopio invertido Leica DMI3000 B, equipado con una cámara DFC300 FX.

Para la elaboración de la iconografía las imágenes fueron optimizadas mediante el programa informático Adobe Photoshop CS (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, EE.UU.).

# Resultados

---

## 4.1 Proliferación celular: Detección de BrdU

### 4.1.1 Protocolo de administración

La BrdU es un análogo de la timidina que se une al ADN durante la replicación y que marca cualquier célula, glial o neuronal, que se haya dividido durante el tiempo de exposición. El tipo de administración, la concentración y la duración del tratamiento varía en función de los objetivos a estudiar. En teleósteos, se han descrito principalmente tres métodos de administración: disolver la BrdU en el agua del acuario (Otteson *et al.*, 2001; Hitchcock y Kakuk-Atkins, 2004), realizar inyecciones intraoculares (Stenkamp *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2001) o suministrar inyecciones intraperitoneales (Santamaría *et al.*, 1996; Mack *et al.*, 2003; Takeda *et al.*, 2008).

Nuestro objetivo principal es marcar todas las células pertenecientes al linaje de progenitores de bastón. Debido a la baja tasa de división de los progenitores localizados en la CNI, debemos utilizar un protocolo que se pueda prolongar en el tiempo para detectar el mayor número de células posible. Además, también es importante determinar la dosis de BrdU, ya que a altas concentraciones puede resultar tóxica para el animal. El método de administración utilizado en el presente trabajo fue el de inyección intraperitoneal, que permite establecer la dosis de BrdU y no entraña riesgo de lesión en la retina. El siguiente paso fue determinar la dosis óptima y el número de inyecciones necesarias para mantener una concentración adecuada y constante en el animal. Para ello utilizamos tres grupos experimentales en los que variamos tanto la concentración de BrdU inyectada, como el intervalo de tiempo entre las inyecciones (Tabla 5). Todos los animales fueron mantenidos en un acuario con colorantes orgánicos y sacrificados siete días después de empezar el tratamiento.

Nº de animales	Concentración	Intervalo entre inyecciones	Supervivencia
10	0.2 µg/ml	24 horas (7 inyecciones)	50%
10	0.2 µg/ml	48 horas (4 inyecciones)	100%
10	0.4 µg/ml	48 horas (4 inyecciones)	90%

**Tabla 5:** Grupos experimentales utilizados para determinar el protocolo óptimo de administración de BrdU.

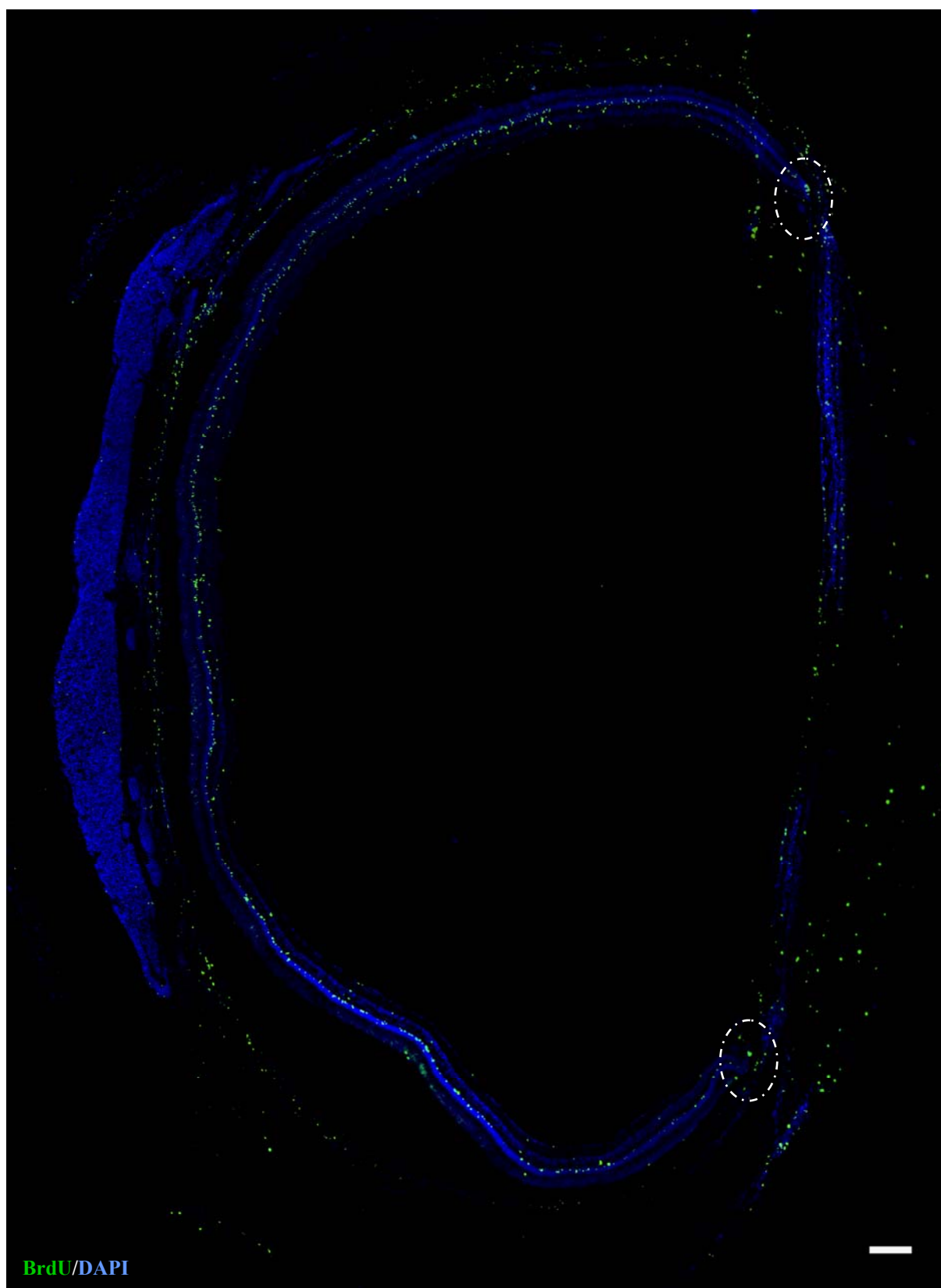
Tras procesar el tejido, se realizó una inmunohistoquímica contra BrdU. El análisis del tejido demostró que no existían diferencias significativas ni en el número de células marcadas ni en la intensidad del marcaje entre los distintos grupos experimentales. Aunque los tres grupos mostraban resultados óptimos en la incorporación de BrdU, la tasa de supervivencia de los animales variaba considerablemente. El 50% de los animales que fueron inyectados cada 24 horas y el 10% de los que se les administró la mayor dosis de BrdU murieron durante el tratamiento. Por tanto, los mejores resultados se obtuvieron con una concentración de 0.2 µg/ml de BrdU y con intervalos de inyección de 48 horas.

### 4.1.2 Localización de las células proliferativas

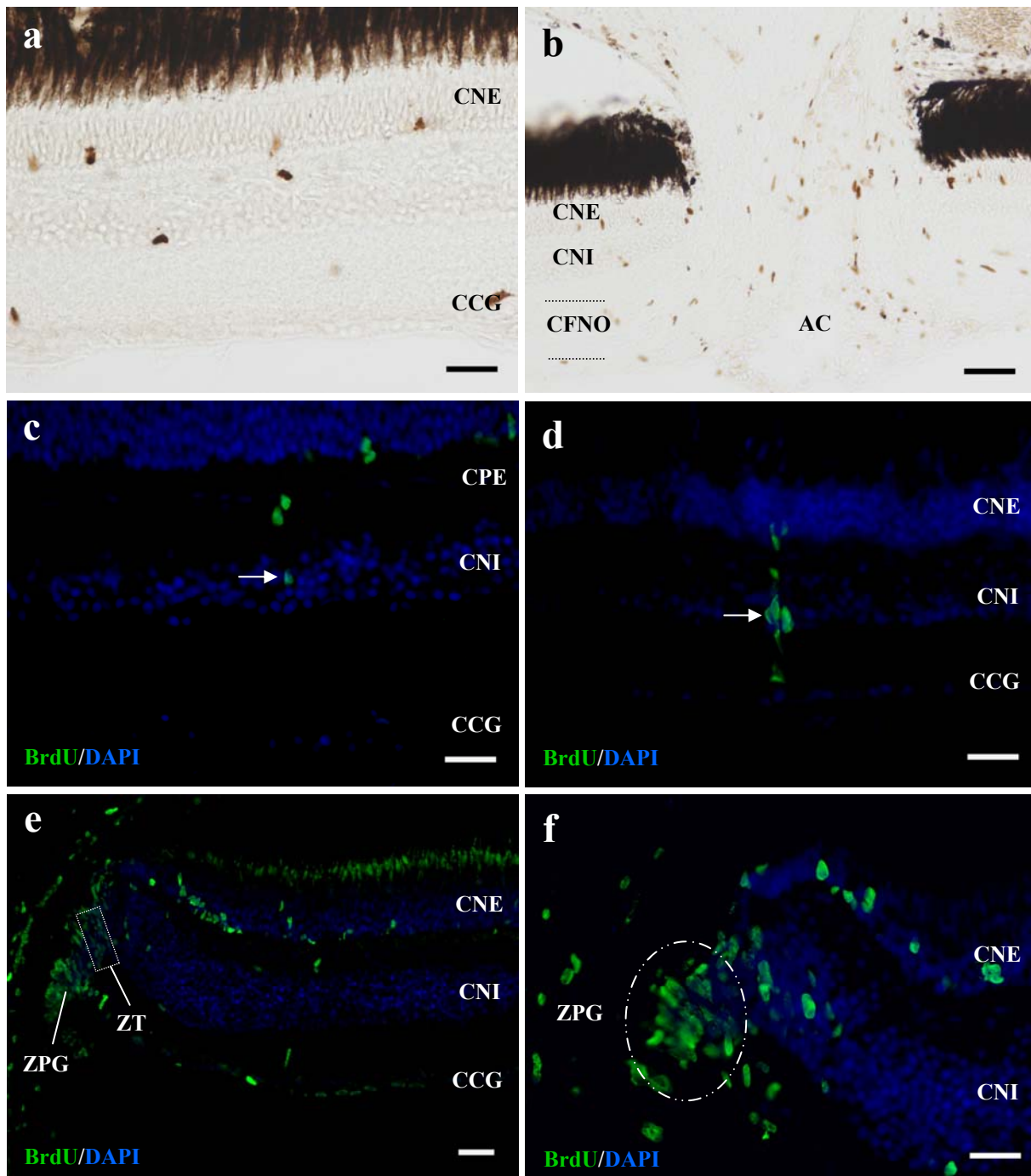
Las células positivas a BrdU se distribuyeron por toda la retina y en todas las capas de la misma (Fig. 22, 23a). La distribución de los progenitores de bastón en la retina madura no es homogénea, ya que dependiendo de la región se concentran mayoritariamente en una, o en varias capas.

En la retina central las células proliferativas se concentran principalmente en la región más escleral, la CNI, CPE y CNE (Fig. 23a,c,d). En la CNI se distinguen dos poblaciones diferentes: pequeños grupos de células con núcleos fusiformes dispuestos perpendicularmente a la laminación de la retina (Fig. 23d); y células aisladas dispersas por toda la capa (Fig. 23a,c). Aunque también hemos observado núcleos marcados para BrdU en la CPI y la CCG (Fig. 23d,e), su número es mucho menor. Tanto en la cabeza del nervio óptico (CNO) como en la CFNO se distinguen numerosos núcleos que han incorporado BrdU (Fig. 23b).

En la retina madura adyacente a la ZT encontramos numerosos núcleos marcados alineados en la región más escleral de la CNE (Fig. 23e). En la región periférica de la retina se observa una gran densidad de núcleos positivos a BrdU (Fig. 23e,f). Prácticamente la totalidad de los núcleos de la ZPG han incorporado BrdU, y en la ZT también observamos numerosos núcleos marcados (Fig. 23e,f). Mientras que en la ZPG la morfología de los núcleos positivos es fusiforme, en la ZT los núcleos son más redondeados.



**Fig. 22: Reconstrucción de una retina completa marcada con BrdU y DAPI.** En la imagen se han marcado con un círculo las dos ZPG. Barra de escala: 150  $\mu$ m

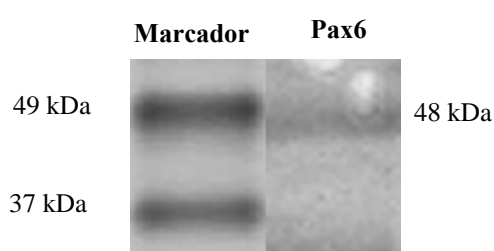


**Fig 23: Incorporación de BrdU.** Inmunohistoquímica contra BrdU según el método ABC (**a** y **b**) y el método fluorescente (**c-f**). En regiones centrales de la retina madura, las células proliferativas se distribuyen a lo largo de todas las capas (**a**, **c** y **d**). En la CNI se encuentran núcleos marcados aislados (flecha en **c**) o pequeños grupos con morfología fusiforme (flecha en **d**). En la CNO se distinguen numerosos núcleos fusiformes marcados para BrdU (**b**). En la zona periférica (**e** y **f**), las células proliferativas se concentran principalmente en la ZPG, ZT y en la CNE de la región madura. Barra de escala: 20  $\mu$ m en **a**, **b**, **c**, **d** y **f**; 40  $\mu$ m en **e**.

## 4.2 Inmunorreactividad para marcadores neurales en la retina madura

### 4.2.1 Pax6

Para comprobar la especificidad del anticuerpo contra Pax6 hemos realizado la técnica de *Western Blot* y hemos obtenido una banda de aproximadamente 48 kDa (Fig. 24). Esta banda se corresponde con el peso molecular descrito para Pax6 en pez cebra.



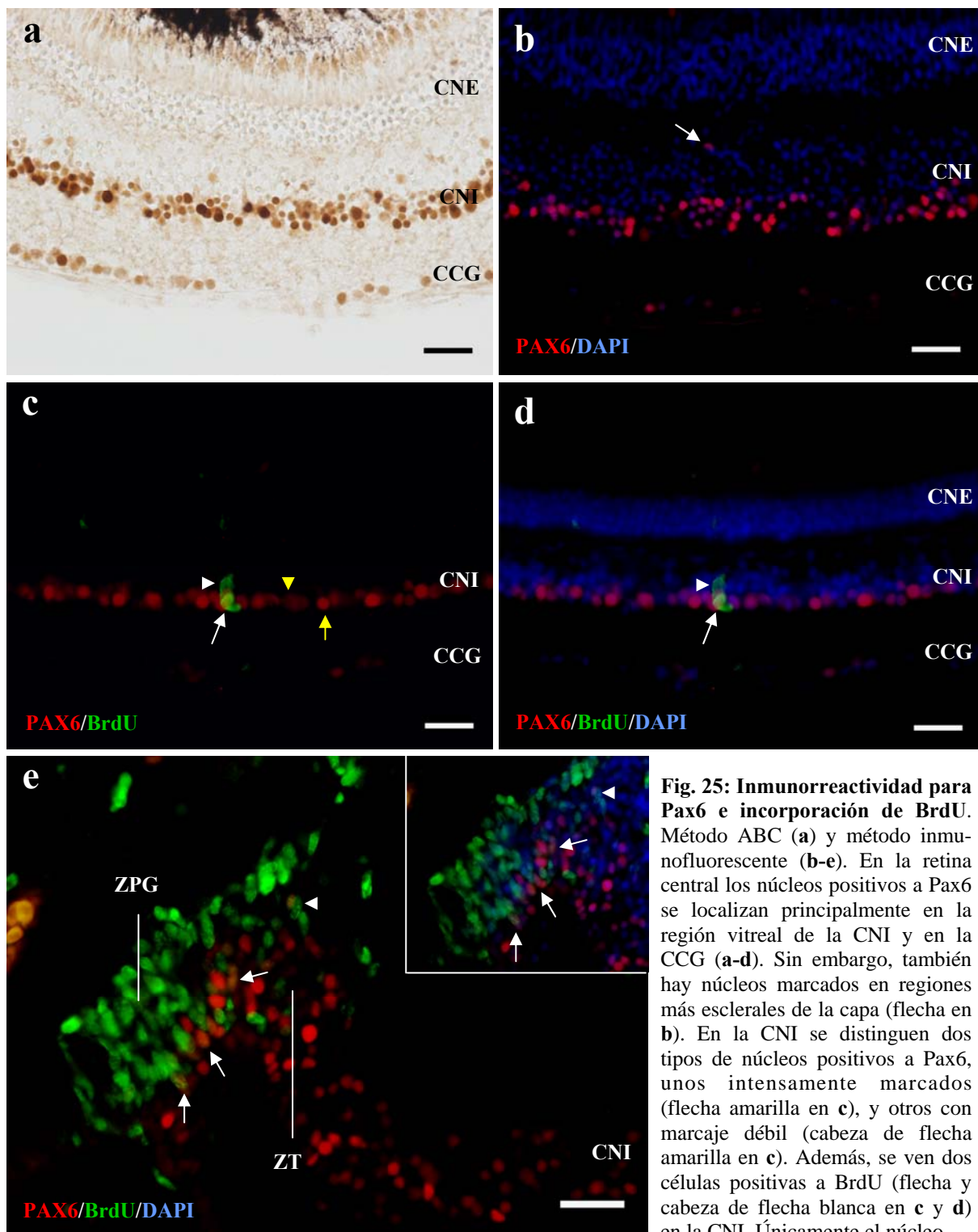
**Fig. 24:** Análisis de *Western Blot* de Pax6 en retina de carpín.

En la retina madura, Pax6 se expresa principalmente en la región más vitreal de la CNI. Los núcleos positivos a Pax6 se organizan formando varias hileras (Fig. 25a,b) o una sola (Fig. 25c,d) en la CNI y, aunque su morfología es siempre redondeada, la intensidad del marcaje puede variar (Fig. 25c).

En la región de la retina madura más próxima a la ZT, la inmunorreactividad para Pax6 es mayor (Fig. 25e), ya que los núcleos marcados ocupan casi la mitad del espesor de la CNI, mientras que en las regiones centrales sólo distinguimos varias hileras de núcleos positivos. En la CCG hemos observado una hilera de núcleos grandes marcados para Pax6 (Fig. 25a-d), y al igual que en la CNI, vemos diferencias en la intensidad del marcaje (Fig. 25a). En algunas ocasiones hemos identificado núcleos positivos para Pax6 en la zona escleral de la CNI próxima a la CPE (Fig. 25b). Estos núcleos siempre se localizan en regiones cercanas a la periferia. En la zona periférica de la retina hemos observado núcleos positivos a Pax6 tanto en la ZPG como en la ZT (Fig. 25e). En la ZPG los núcleos positivos para Pax6 poseen una morfología fusiforme, mientras que en la ZT son más redondeados.

La colocalización de Pax6 y BrdU en la retina es muy escasa, ya que en las regiones centrales sólo hemos observado unas pocas células inmunorreactivas para ambos marcadores (Fig. 25c,d). En todos los casos estos núcleos se localizan en la zona más vitreal de la CNI, y más específicamente en la primera hilera de núcleos positivos a Pax6. En la ZPG, la mayor parte de los núcleos positivos a Pax6 lo son también para BrdU (Fig. 25e). En la ZT sólo algunas de las células Pax6-positivas han incorporado BrdU. Además, éstas células se sitúan exclusivamente en la región donde se organiza la CNI de la retina madura (Fig. 25e).



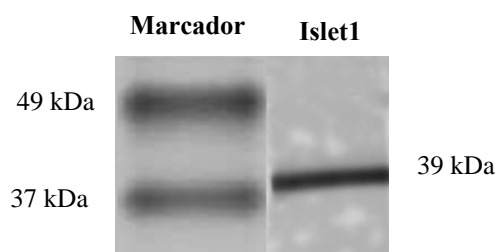


**Fig. 25: Inmunorreactividad para Pax6 e incorporación de BrdU.** Método ABC (**a**) y método inmunofluorescente (**b-e**). En la retina central los núcleos positivos a Pax6 se localizan principalmente en la región vitreal de la CNI y en la CCG (**a-d**). Sin embargo, también hay núcleos marcados en regiones más esclerales de la capa (flecha en **b**). En la CNI se distinguen dos tipos de núcleos positivos a Pax6, unos intensamente marcados (flecha amarilla en **c**), y otros con marcaje débil (cabeza de flecha amarilla en **c**). Además, se ven dos células positivas a BrdU (flecha y cabeza de flecha blanca en **c** y **d**) en la CNI. Únicamente el núcleo

situado en la primera hilera (flecha blanca) es positivo para Pax6. **e**) Inmunorreactividad para Pax6 y BrdU en la región periférica de la retina. En el inserto se muestra la ZPG contrastada con DAPI. Hay núcleos positivos a Pax6 tanto en la ZPG como en la ZT, y además, muchos de estos núcleos son también positivos para BrdU (ZPG: flechas; ZT: cabeza de flecha). Barra de escala: 20  $\mu$ m.

### 4.2.2 Islet1

Tras realizar el *Western Blot* (Fig. 26) para la proteína Islet1 obtuvimos un banda de aproximadamente 39 kDa, lo que coincide con el peso molecular de la proteína en pez cebra.



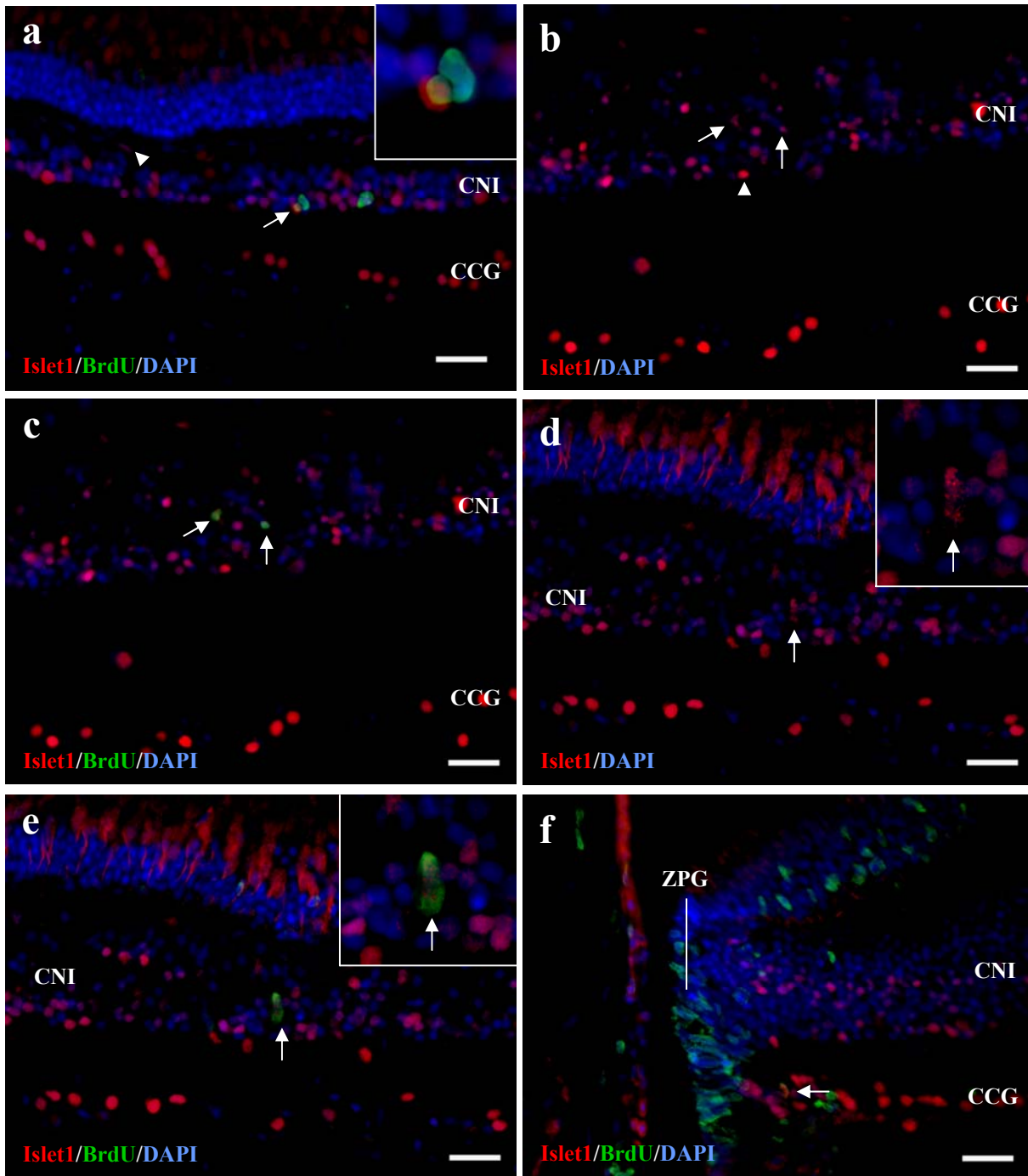
**Fig. 26:** Análisis de *Western Blot* de Islet1 en retina de carpín.

La expresión de Islet1 es abundante en la retina de carpín. Hemos identificado células positivas a este marcador en todas las capas a excepción de la CNE y las capas plexiformes. En la CNI, los núcleos positivos a Islet1 son de pequeño tamaño y se distribuyen de manera homogénea por toda la capa (Fig. 27a-d).

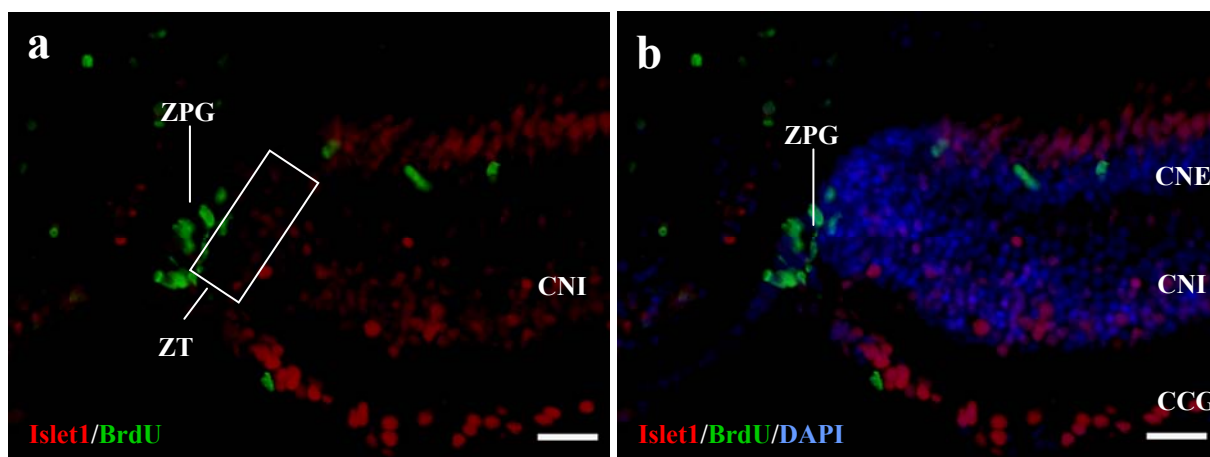
En las regiones vitreales y centrales de la capa, los núcleos poseen una morfología redondeada (Fig. 27a,b), mientras que en la zona adyacente a la CPE son más fusiformes (Fig. 27d,e). En la región más escleral de la CNI se distinguen núcleos positivos a Islet1 con una morfología aplanada (Fig. 27a). Además de en la morfología, también hay variaciones en la intensidad del marcaje. Aparecen núcleos intensamente marcados y núcleos con un marcaje mucho más débil (Fig. 27b). En la CCG hemos visto una hilera de núcleos grandes y redondeados marcados para Islet1 (Fig. 27a-f).

Aunque la ZPG es inmunonegativa para Islet1, en algunas secciones encontramos núcleos positivos en la ZT (Fig. 28a). Dichos núcleos poseen una morfología redondeada y su marcaje es más débil que el encontrado en las regiones de retina madura. Se distribuyen en el límite de la ZT con la retina madura, tanto en la región que va a formar la CNE como en la CNI y la CCG (Fig. 28a,b).

A pesar de que la distribución de las células Islet1-positivas es muy amplia, la colocalización de BrdU con dicho marcador está muy restringida. En las regiones centrales de la retina las células Islet1 y BrdU positivas se localizan exclusivamente en la CNI, más concretamente en las zonas vitreal y central de la capa (Fig. 27a,c,e). Los núcleos doblemente marcados poseen una morfología e intensidad de marcaje variable, núcleos tanto redondeados (Fig. 27a,c) como fusiformes (Fig. 27e), y débil (Fig. 27c,e) o intensamente marcados (Fig. 27a) para Islet1. Además, en algunas ocasiones hemos observado células positivas para ambos marcadores en la CCG de la retina madura adyacente a la ZT (Fig. 27f).



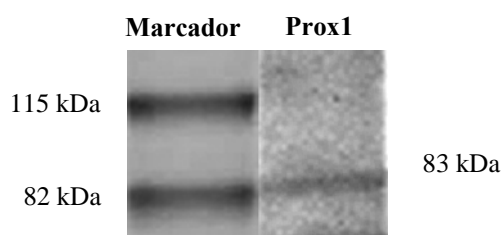
**Fig. 27: Inmunorreactividad para Islet1 e incorporación de BrdU.** Islet1 se localiza principalmente en la CNI y en la CCG. **a)** Núcleo doblemente marcado para Islet1 y BrdU (flecha) localizado en la región más vitreal de la CNI, posee una morfología redondeada y está intensamente marcado para Islet1. En la zona escleral de la CNI se distinguen núcleos con morfología aplanada positivos para Islet1 (cabeza de flecha). En el margen superior derecho se muestra a más aumento el núcleo doblemente marcado. **b)** En la CNI se aprecian diferentes intensidades de marcaje, ya que se observan núcleos débil (flechas) e intensamente (cabeza de flecha) marcados para Islet1. **c)** En la misma sección, se distinguen dos núcleos positivos para Islet1 y BrdU (flechas). Dichos núcleos poseen una morfología redondeada y están débilmente marcados para Islet1. **d)** y **e)** Dos núcleos positivos a Islet1 (flecha) con morfología fusiforme localizados en la región central de la CNI, que además han incorporado BrdU. En el margen superior derecho de ambas imágenes se muestran a más aumento las células marcadas. **f)** Núcleo positivo a Islet1 y a BrdU en la CCG de la retina madura adyacente a la ZT (flecha). Barra de escala: 20  $\mu$ m en **a-f**; 10  $\mu$ m en insertos de **a**, **d** y **e**.



**Fig. 28: Inmunorreactividad para Islet1 e incorporación a BrdU.** a y b) En la región periférica de la retina, la expresión de Islet1 se limita a la zona más externa de la ZT (recuadro en a). Dichas células poseen una morfología redondeada y están débilmente marcadas. Barra de escala: 20  $\mu$ m.

### 4.2.3 Prox1

Tras realizar la técnica de *Western Blot* para determinar la especificidad del anticuerpo, la banda obtenida para Prox1 tiene un peso molecular de aproximadamente 83 kDa, y se corresponde con lo descrito anteriormente en carpín (Fig. 29).



**Fig. 29:** Análisis de *Western Blot* de Prox1 en retina de carpín.

El factor de transcripción Prox1 se expresa en la CNI y CCG de la retina. En la CNI la mayor parte de los núcleos son Prox1-positivos (Fig. 30a-e). Corresponden a células que poseen morfología redondeada o fusiforme y que se distribuyen por todo el espesor de la capa. La intensidad del marcaje y el tamaño de los núcleos marcados es variable (Fig. 30a).

En el estrato de las células horizontales, encontramos núcleos con morfología aplanada positivas a Prox1 (Fig. 30a). Las células marcadas tienen el eje mayor paralelo a la laminación de la retina. En el estrato inmediatamente vitreal al anterior, ocupado por los terminales de las células horizontales hemos observado algunos núcleos redondeados positivos a Prox1 (Fig. 30a,b). En la retina madura adyacente a la ZT los núcleos Prox1 positivos poseen una morfología más fusiforme (Fig. 31b,c), y en algunos casos hemos observado núcleos marcados

## *Resultados*

---

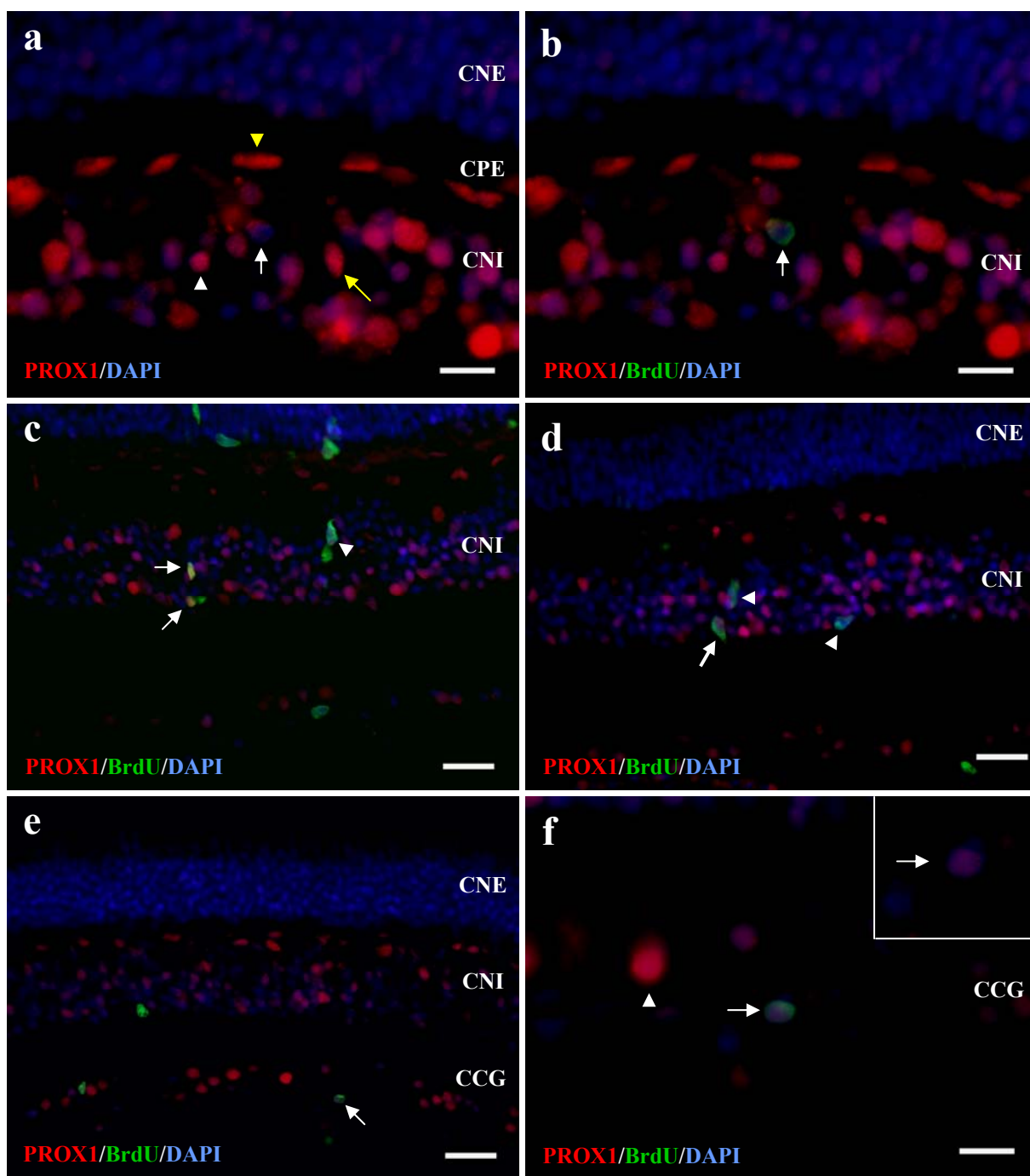
para Prox1 en la región vitreal de la CNE (Fig. 31c,d).

Se observan también células positivas a Prox1 en la CCG. En esta capa se distinguen dos tipos de núcleos Prox1-positivos: núcleos de gran tamaño, redondeados y muy intensamente marcados que se organizan formando una hilera, y núcleos de pequeño tamaño y morfología variable que se intercalan entre los núcleos más grandes (Fig. 30f).

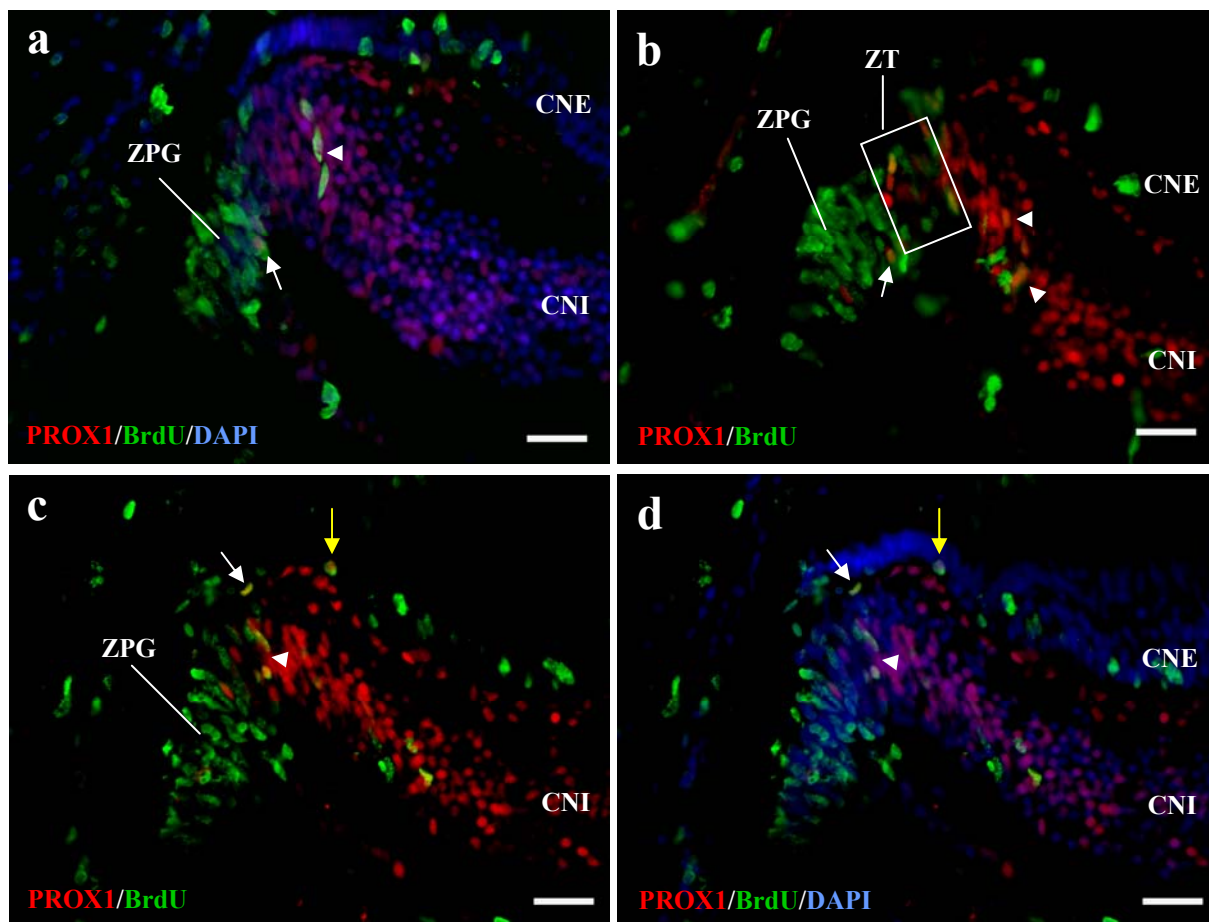
La región periférica de la retina también presenta gran cantidad de núcleos Prox1-positivos (Fig. 31a-d). En la ZPG hemos observado núcleos grandes y fusiformes positivos para Prox1, que se localizan tanto en la zona adyacente a la ZT como en las regiones centrales de la ZPG (Fig. 31a,b). La ZT también presenta numerosas células intensamente marcadas (Fig. 31b).

Encontramos núcleos doblemente positivos a BrdU y a Prox1 en prácticamente todos los estratos de la CNI (Fig. 30b-d). Dichos núcleos se sitúan por todo el espesor de la capa, pero su número es mayor en las zonas vitreales y centrales. Se distinguen dos morfologías diferentes, núcleos redondeados (Fig. 30b,c) y núcleos con morfología fusiforme y dispuestos perpendicularmente a la laminación de la retina (Fig. 30c,d). De forma puntual hemos encontrado células doblemente marcadas en la CCG, poseen menor tamaño y el marcaje para Prox1 es muy débil (Fig. 30e,f). En la zona periférica de la retina hay colocación de ambos marcadores tanto en la ZPG como en la ZT (Fig. 31a-d). En la ZPG encontramos núcleos positivos a Prox1 y BrdU tanto en la zona central como en la zona limitante con la ZT (Fig. 31a,b). En la retina madura adyacente a la ZT vemos, en algunos casos, núcleos doblemente marcados. Dichos núcleos poseen diferente morfología en función de su localización, en la zona vitreal de la CNI los núcleos son aplanados y en la CNE redondeados (Fig. 31c,d).





**Fig. 30: Inmunofluorescencia para Prox1 y BrdU.** a) En la CNI los núcleos Prox1-positivos se distribuyen por toda la capa y poseen diferentes morfologías e intensidad de marcaje. Por un lado hay núcleos redondeados (flecha y cabeza de flecha blanca) y fusiformes (flecha amarilla) y por otro, núcleos débil (flecha blanca) e intensamente marcados (cabeza de flecha blanca). Además, se observan núcleos con morfología aplanada positivos a Prox1 (cabeza flecha amarilla). b-d) En la retina madura los núcleos positivos para Prox1 y BrdU se localizan en todos los estratos de la CNI (flechas en b, c y d). Sin embargo, no todas las células que han incorporado BrdU son Prox1 positivas (cabezas de flecha en c y d). e) Núcleos doblemente marcados para Prox1 y BrdU en la CCG (flecha). f) Ampliación de la figura e donde se muestra con mayor detalle el núcleo positivo a ambos marcadores (flecha). Además, también se ve un núcleo de gran tamaño e intensamente marcado para Prox1 que no ha incorporado BrdU (cabeza de flecha). En el inserto superior se aprecia que el núcleo doblemente marcado está débilmente teñido para Prox1. Barra de escala: 10  $\mu$ m en a, b y f; 20  $\mu$ m en c, d y e.



**Fig. 31: Marcaje inmunofluorescente para Prox1 y BrdU.** En la región periférica de la retina hay expresión de Prox1, tanto en la ZPG como en la ZT. En la ZPG se distinguen núcleos positivos para Prox1 y para BrdU (flechas en **a** y **b**). La expresión de Prox1 en la ZT es muy intensa y también hay numerosos núcleos doblemente marcados (**b**). En la retina madura adyacente a la ZT se ven núcleos con morfología fusiforme marcados para Prox1 y BrdU (cabeza de flechas en **a-d**). En casos puntuales se encuentra colocalización de ambos marcadores en la CNE de la retina madura adyacente a la ZT (flecha amarilla en **c** y **d**). Además, se aprecian núcleos con morfología aplanada positivos a Prox1 y BrdU en la región más vitreal de la CNI (flecha blanca en **c** y **d**). Barra de escala: 20  $\mu$ m.

### 4.2.4 NeuroD

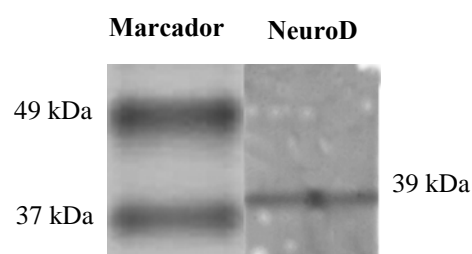
Mediante la técnica de *Western Blot* hemos obtenido una banda de aproximadamente 39 kDa que coincide con el peso molecular de NeuroD descrito en el pez cebra (Fig. 32).

El marcaje inmunohistoquímico para la proteína NeuroD se observa fundamentalmente en la CNI y en la CCG de la retina (Fig. 33 y 34a, b). En la zona vitreal de la CNI hemos visto núcleos redondeados positivos a NeuroD que se organizan formando una o dos hileras. En algunos casos vemos núcleos positivos en regiones más centrales de la capa (Fig. 33a). Al

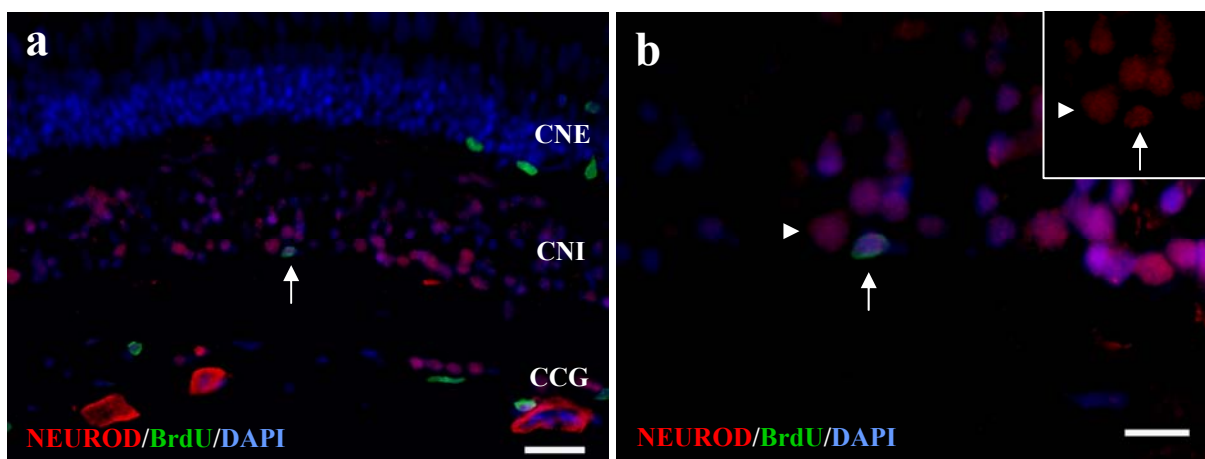
igual que ocurre con otros marcadores estudiados, se observan diferencias en la intensidad de marcaje de los núcleos localizados en la CNI (Fig. 34a,b). En la CCG el patrón de expresión de NeuroD es muy similar al observado en la CNI. Los núcleos positivos tienen morfología redondeada y se distribuyen formando una hilera (Fig. 33a,34c).

En la región periférica de la retina la inmunorreactividad para NeuroD es muy escasa. En la mayoría de los ejemplares, tanto la ZPG como la ZT son inmunonegativas para NeuroD (Fig. 34d). Sólo en algunos casos hemos observado núcleos débilmente marcados en la ZT (Fig. 34e, f).

La presencia de BrdU en núcleos NeuroD positivos es muy escasa. En las regiones centrales de la retina, la colocación se limita a la CNI, concretamente a la primera hilera de núcleos positivos a NeuroD (Fig. 33b). De forma puntual vemos núcleos positivos para ambos marcadores en la segunda hilera, sin embargo dichos núcleos están débilmente marcados para NeuroD (Fig. 34a,b). En regiones cercanas a la periferia, hemos visto núcleos que colocan NeuroD y BrdU en la CCG (Fig. 34c). En ningún caso se aprecian núcleos doblemente marcados en la zona periférica de la retina, ni en la ZPG, ni en la ZT (Fig. 34d-f).

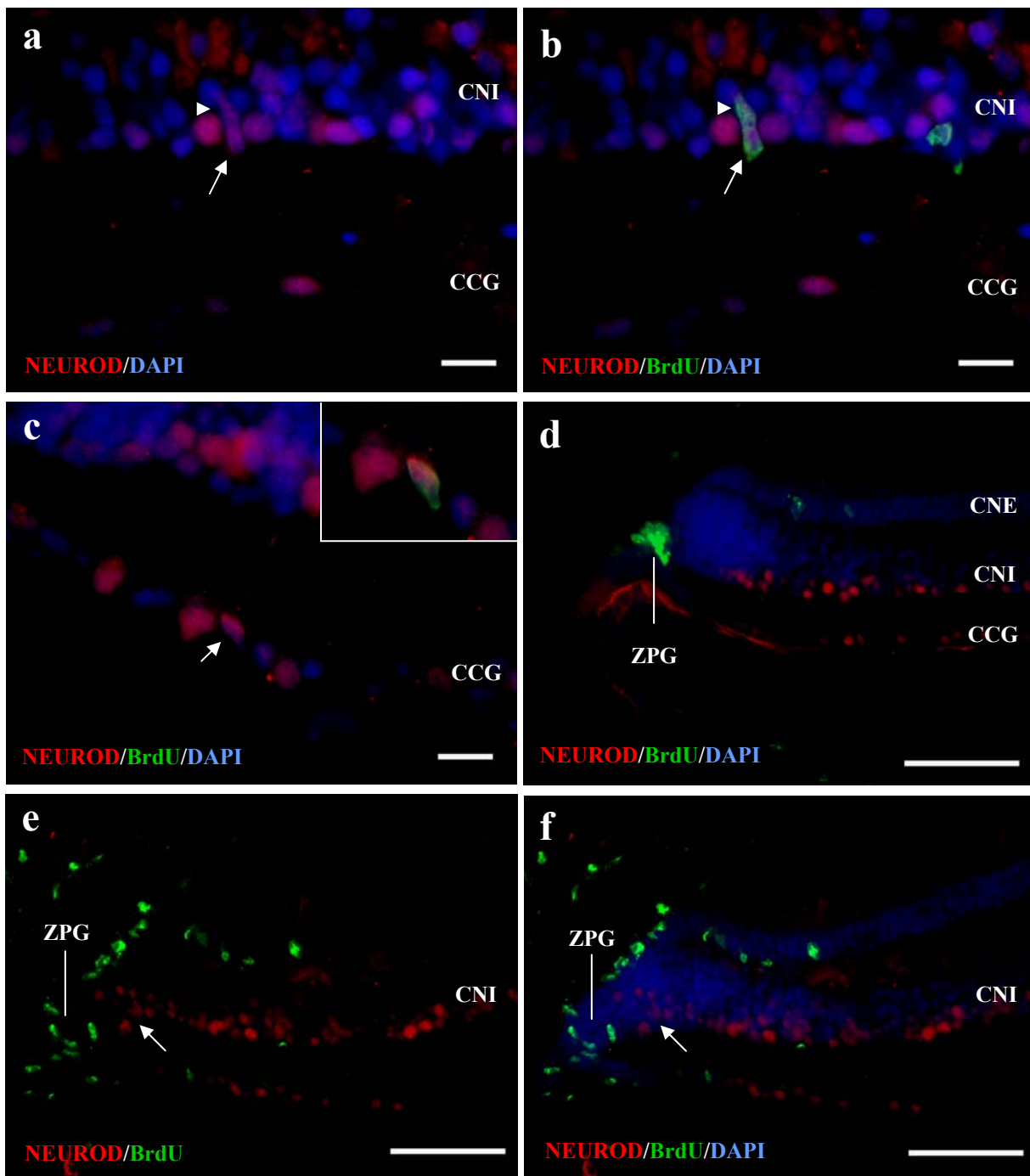


**Fig. 32:** Análisis de *Western Blot* de NeuroD en retina de carpín.



**Fig. 33:** Marcaje inmunofluorescente contra NeuroD y BrdU. **a)** Doble marcaje para BrdU y NeuroD, se aprecia un núcleo con morfología redondeada situado en la región más vitreal de la CNI (flecha). **b)** Aumento del núcleo doblemente marcado de la imagen **a**. Se observa que el núcleo que ha incorporado BrdU (flecha) está marcado débilmente para NeuroD (inserto superior), mientras que por el contrario, el núcleo situado junto a él está intensamente teñido (cabeza de flecha). Barra de escala: 20  $\mu$ m en **a**; 10  $\mu$ m en **b**.



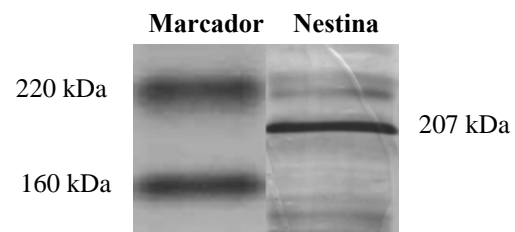


**Fig. 34: Inmunofluorescencia contra NeuroD e incorporación de BrdU.** **a y b)** Se distinguen dos núcleos (flecha y cabeza de flecha) que han incorporado BrdU, pero mientras uno de ellos (flecha) está intensamente marcado para NeuroD, el otro (cabeza de flecha) apenas posee marcaje para el factor de transcripción. **c)** Se distinguen núcleos intensamente marcados para NeuroD en la CCG. En el inserto superior se observa una ampliación del núcleo señalado con una flecha. Dicha célula colocaliza para BrdU. **d)** La zona periférica de la retina es inmunonegativa para NeuroD. **e y f)** De forma puntual se ven núcleos débilmente marcados para NeuroD (flecha) en la ZT. Barra de escala: 10  $\mu$ m en **a, b y c**; 20  $\mu$ m en **d, e y f**.

### 4.2.5 Nestina

Para determinar la especificidad del anticuerpo y tras realizar la técnica de *Western Blot* obtuvimos una banda de aproximadamente 207 kDa, lo que concuerda con el peso molecular de Nestina descrito en ratón (Fig. 35).

En la CNI es donde se concentran la mayor parte de los núcleos positivos a Nestina. Se distribuyen principalmente en la zona vitreal y central de la capa y su densidad disminuye a medida que nos acercamos al límite con la CPE (Fig. 36a-f). Los núcleos están intensamente

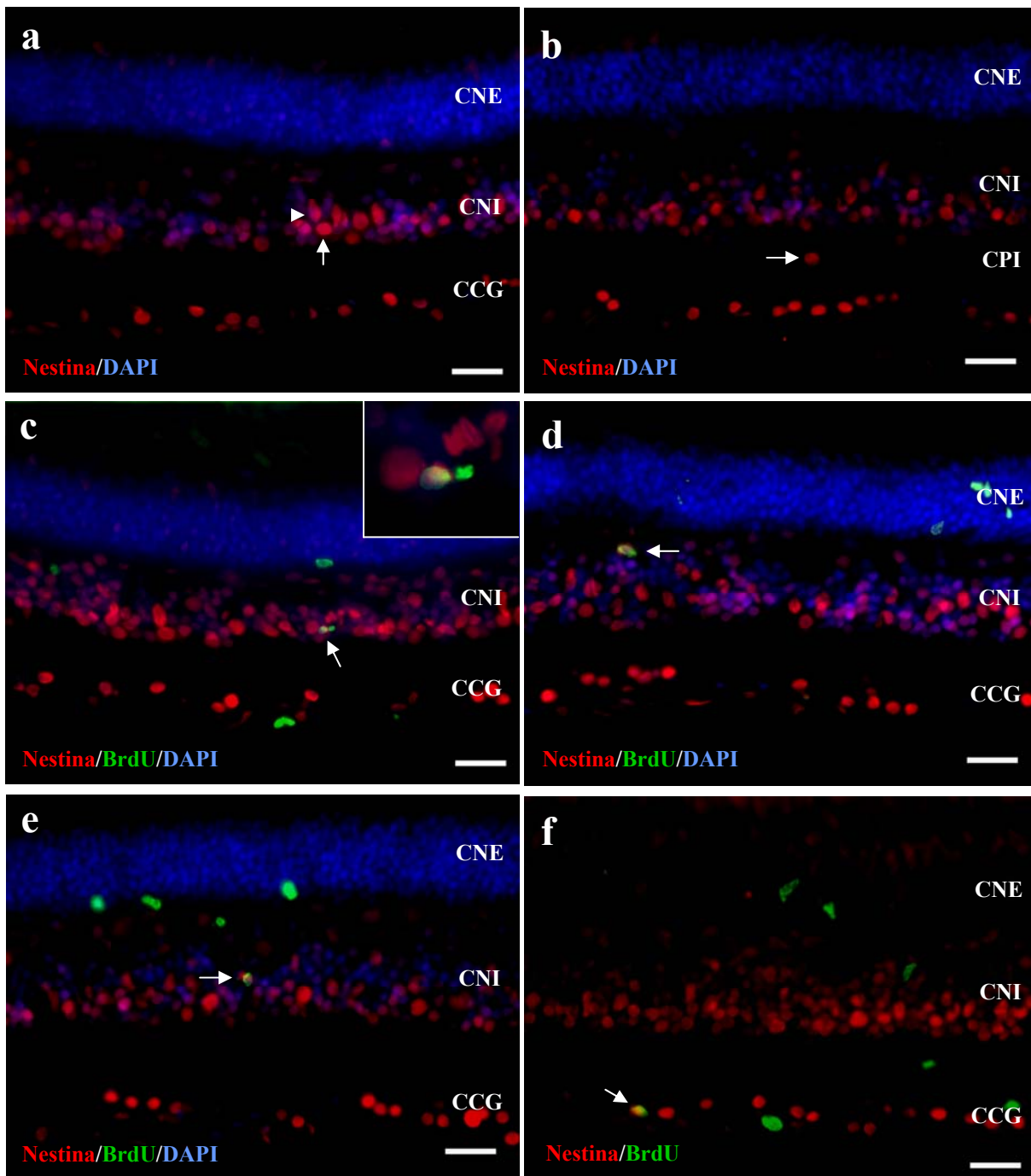


**Fig. 35:** Análisis de *Western Blot* de Nestina en retina de carpín.

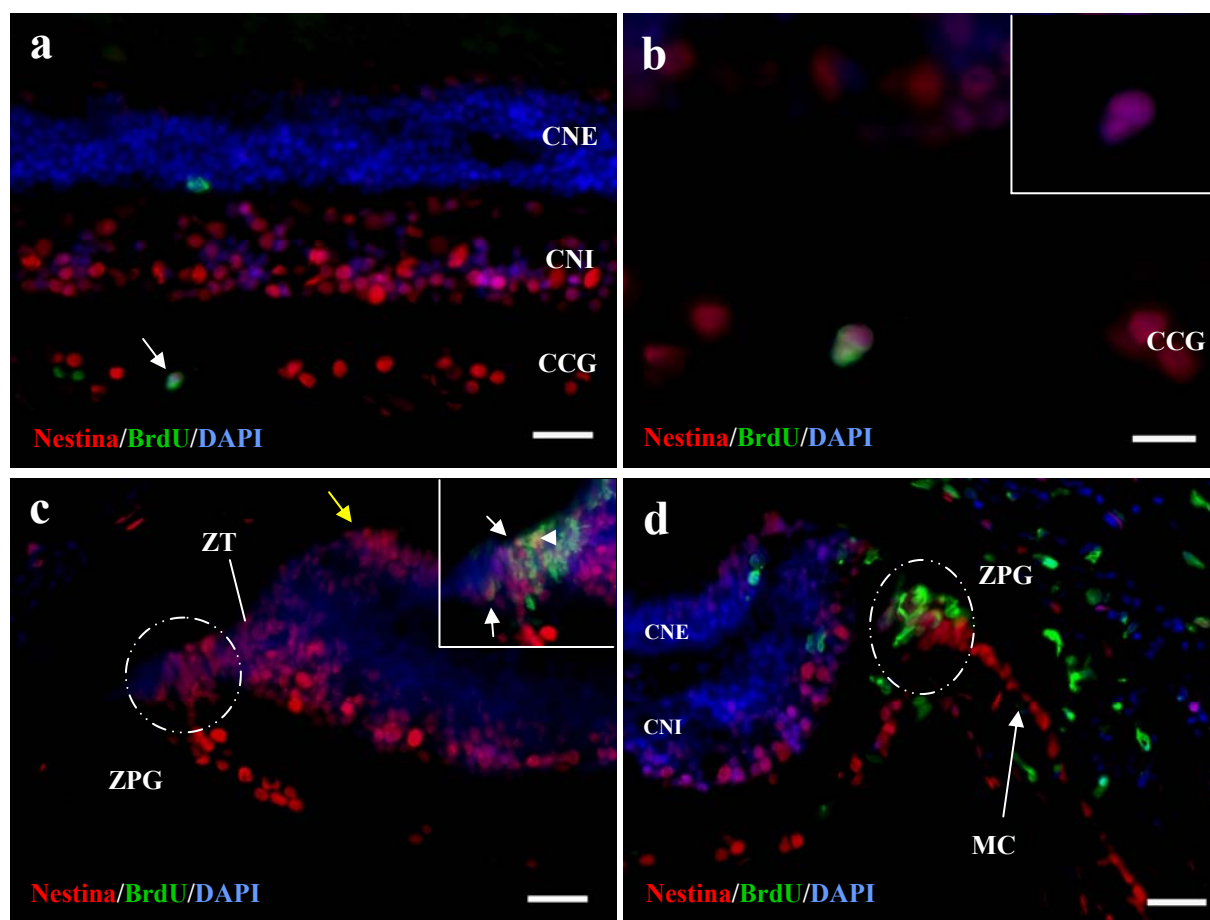
marcados y aunque su morfología es tanto redondeada como fusiforme, no observamos diferencias en cuanto a la intensidad del marcaje (Fig. 36a). En la CCG también encontramos núcleos inmunorreactivos para Nestina, son núcleos grandes que se disponen formando una hilera (Fig. 36a-f). Ocasionalmente hemos observado núcleos positivos para Nestina en la CPI (Fig. 36b). En todas las secciones estudiadas se distinguen núcleos positivos a Nestina en la CNE, aunque este marcaje se localiza exclusivamente en la zona adyacente a la ZT (Fig. 37c), nunca en la retina central.

La región periférica presenta alta inmunorreactividad para Nestina. No sólo hemos visto núcleos positivos en la ZPG y la ZT, sino que el margen ciliar (MC) también presenta Nestina. Mientras que los núcleos positivos para Nestina en la ZPG presentan una morfología fusiforme, en la ZT son más redondeados (Fig. 37c,d).

Hemos observado colocalización de BrdU y Nestina en todos los niveles de la CNI, en la zona vitreal, central, y en el límite con la CPE (Fig. 36c-e). La morfología de los núcleos doblemente marcados varía, ya que hemos visto unos núcleos redondeados (Fig. 36c,d) y otros fusiformes (Fig. 36e). En la CCG también se observan núcleos positivos a ambos marcadores (Fig. 36f, 37a,b). Casi la totalidad de los núcleos Nestina positivos en la ZPG han incorporado también BrdU (Fig. 37c,d). En la ZT también encontramos núcleos doblemente marcados que se localizan en la región más cercana a la ZPG (Fig. 37c,d).



**Fig. 36: Inmunofluorescencia contra Nestina y BrdU.** **a)** Células positivas a Nestina en la CNI que presentan dos morfologías diferentes, redondeadas (flecha) y fusiformes (cabeza de flecha). **b)** Núcleo Nestina positivo en la CPI (flecha). **c-e)** Núcleos doblemente marcados para Nestina y BrdU (flechas) situados en todos los niveles de la CNI. El inserto a mayor aumento en **c** muestra un núcleo positivo para ambos marcadores. **f)** En la CCG se distingue un núcleo positivo para Nestina, que además ha incorporado BrdU (flecha). Barra de escala: 20  $\mu$ m en **a-f**; 10  $\mu$ m inserto en **c**.



**Fig. 37: Inmunofluorescencia contra Nestina y BrdU.** a) En la CCG se ve un núcleo doblemente marcado para Nestina y BrdU (flecha). b) Amplificación del núcleo señalado en a, en el inserto se muestra el marcaje simple para Nestina. c) En la ZPG, la ZT y la CNE (flecha amarilla) se observan núcleos intensamente marcados para Nestina. En el inserto superior se muestra como tanto los núcleos de la ZPG (flechas) como los de la ZT (cabeza de flecha) además de ser positivos a Nestina también han incorporado BrdU. d) El margen ciliar (MC) también es inmunorreactivo para Nestina. Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$  en a, c, d; 10  $\mu\text{m}$  en b.

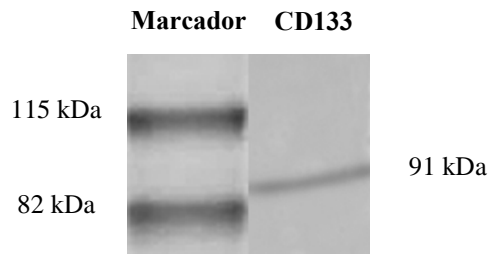
#### 4.2.6 CD133

La especificidad del anticuerpo se determinó mediante la técnica de *Western Blot*. Hemos obtenido una banda de aproximadamente 91 kDa, lo que coincide con lo descrito anteriormente en el pez cebra (Fig. 38).

La inmunorreactividad para CD133 se limita a las regiones central y escleral de la CNI y a los fotorreceptores (Fig. 39a,b,d). En la CNI, el marcaje de CD133 es muy uniforme, ya que todas las células poseen morfología más o menos redondeada y no hemos observado diferencias en la intensidad del marcaje (Fig. 39a,b). Los fotorreceptores son positivos para CD133 y el marcaje se localiza en la superficie externa de toda la célula, incluyendo los

## Resultados

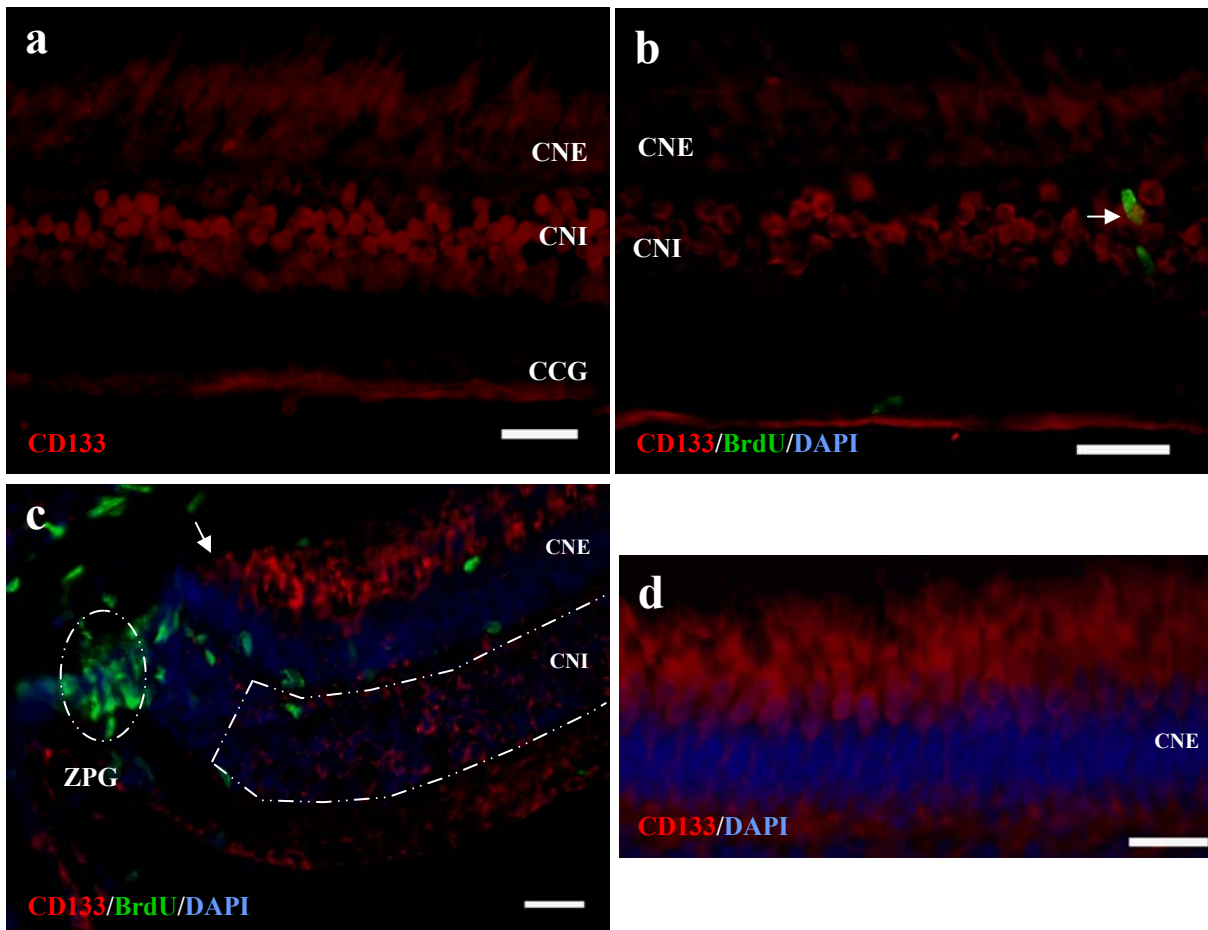
segmentos interno y externo (Fig. 39d). La periferia de la retina es completamente negativa para este marcador, ni la ZPG ni la ZT presentan marcaje (Fig. 39c). En la CNI adyacente a la ZT el marcaje para CD133 es más débil que en regiones maduras de la retina (Fig. 39c), y aumenta a medida que nos alejamos de la zona periférica. En la CNE recién formada hemos



**Fig. 38:** Análisis de *Western Blot* de CD133 en retina de carpín.

observado fotorreceptores intensamente marcados para CD133 (Fig. 39c). En ninguna de las otras capas de la retina vemos inmunorreactividad para CD133.

La colocalización de BrdU y CD133 es escasa y se limita a las regiones central y vitreal de la CNI de la retina madura (Fig. 39b).



**Fig. 39:** Inmunorreactividad para CD133 e incorporación de BrdU. **a** y **b**) Células positivas a CD133 se localizan en la región central y escleral de la CNI. En la región más escleral de la capa se observa una célula doblemente marcada para BrdU y CD133 (flecha en **b**). **c**) La ZPG y la ZT son negativas para CD133 y el marcaje en la retina madura adyacente es mas débil que el descrito en la retina central. Se distinguen fotorreceptores marcados para CD133 en la CNE adyacente a la ZT (flecha). **d**) Fotorreceptores positivos a CD133. Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ .



## 4.3 Expresión de marcadores de células progenitoras

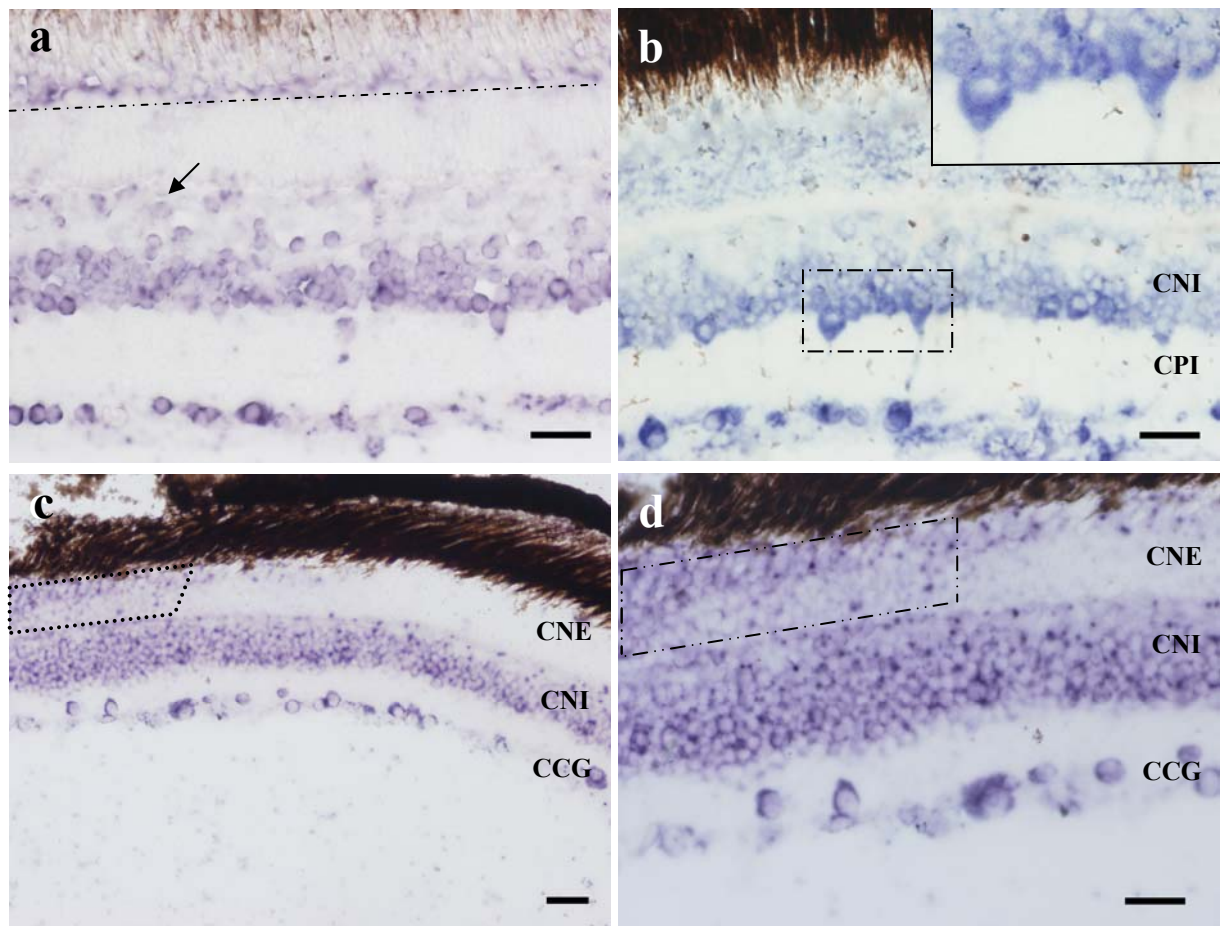
### 4.3.1 Notch1

La expresión de Notch1 se distribuye prácticamente por todas las capas de la retina de carpín (Fig. 40, 41a,b). El marcaje se sitúa principalmente en la periferia de los núcleos, ya sea formando un anillo por todo el perímetro exterior (Fig. 40a), o formando pequeños gránulos (Fig. 41c). En la CNI los núcleos que expresan Notch1 se sitúan en las regiones vitreal y central de la capa, aunque también se encuentran algunos núcleos marcados en el límite con la CPE (Fig. 40a,b). El tamaño y la morfología de los núcleos marcados varía, aunque la mayoría son redondeados. En ocasiones hemos visto núcleos positivos a Notch1 que se localizan en el límite entre la CNI y la CPI (Fig. 40b).

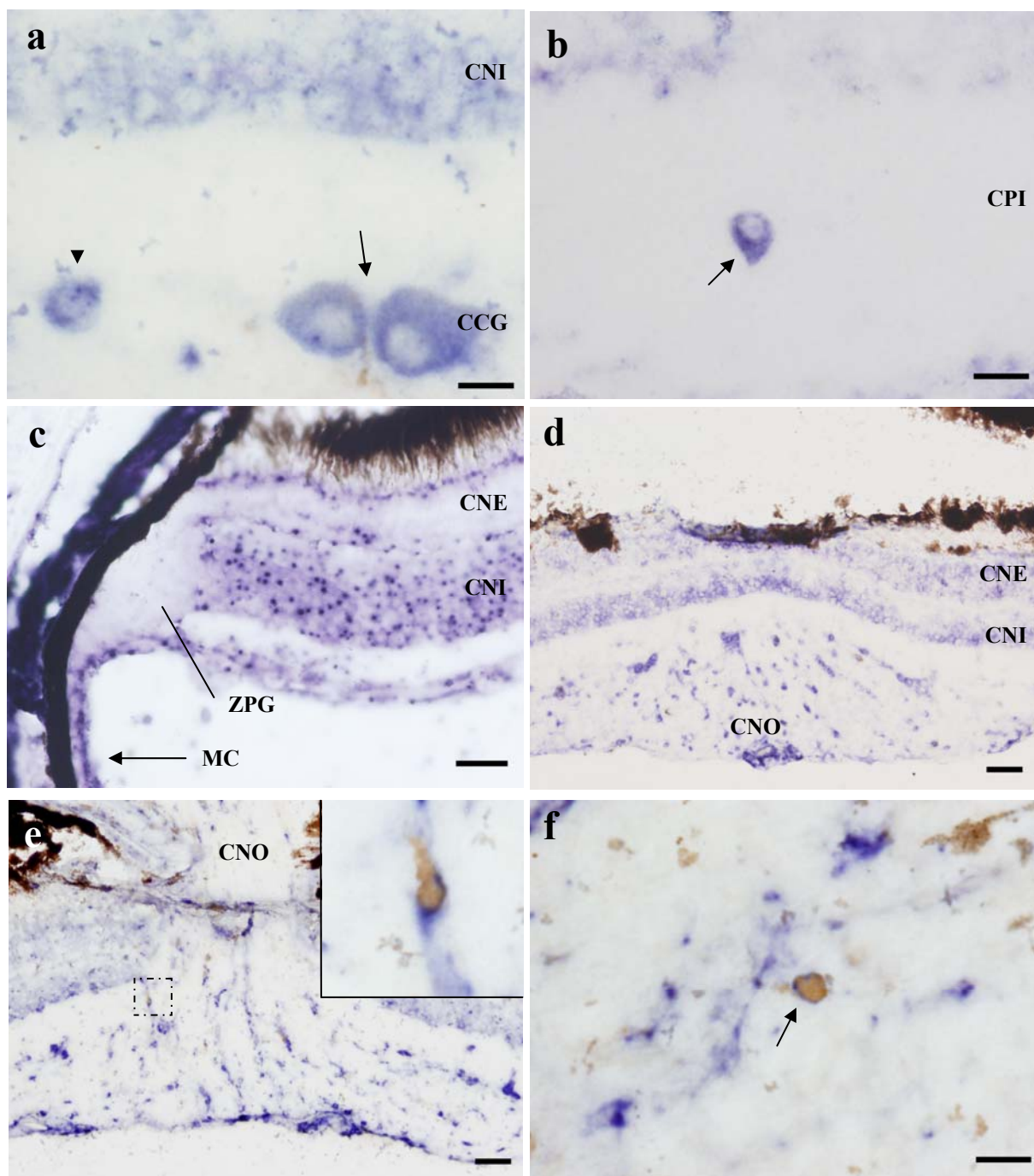
En la CNE los núcleos positivos se distribuyen de forma distinta según la región de la retina (Fig. 40a,c,d). En la CNE de la retina central la expresión de Notch1 es baja y aunque los núcleos positivos se distribuyen por todo el espesor de la capa, su densidad es mayor en la zona escleral (Fig. 40a,b). En la CNE adyacente a la zona periférica encontramos un marcaje diferente, ya que la expresión de Notch1 aumenta y se observan numerosos núcleos marcados por toda la capa (Fig. 40c,d).

En la CCG el marcaje de Notch1 es muy intenso y se distinguen dos tipos de núcleos, núcleos grandes e intensamente marcados y núcleos más pequeños con un marcaje débil (Fig. 41a). En ocasiones observamos núcleos de gran tamaño e intensamente teñidos en la CPI (Fig. 41b). La CNO presenta una alta expresión de Notch1, y se observa cómo los núcleos positivos se disponen formando hileras paralelas a la arteria central (AC) (Fig. 41d,e). En ningún caso hemos observado expresión de Notch1 en la ZPG o en la ZT (Fig. 41c; 42f). En el MC hemos visto núcleos cúbicos intensamente marcados para Notch1 (Fig. 41c).

La colocalización de Notch1 y BrdU se distribuye por todas las capas nucleares de la retina (Fig. 42a-e). En la CNI hemos visto dobles marcajes en regiones vitreales y centrales de la capa (Fig. 42a-c). En la CNE encontramos colocalización de BrdU y Notch1 en regiones centrales de la capa y preferentemente en la zona periférica de la retina (Fig. 42d). En la CCG (Fig. 42e) y la CNO (Fig. 41e,f) se aprecian numerosos núcleos doblemente marcados para Notch1 y BrdU.

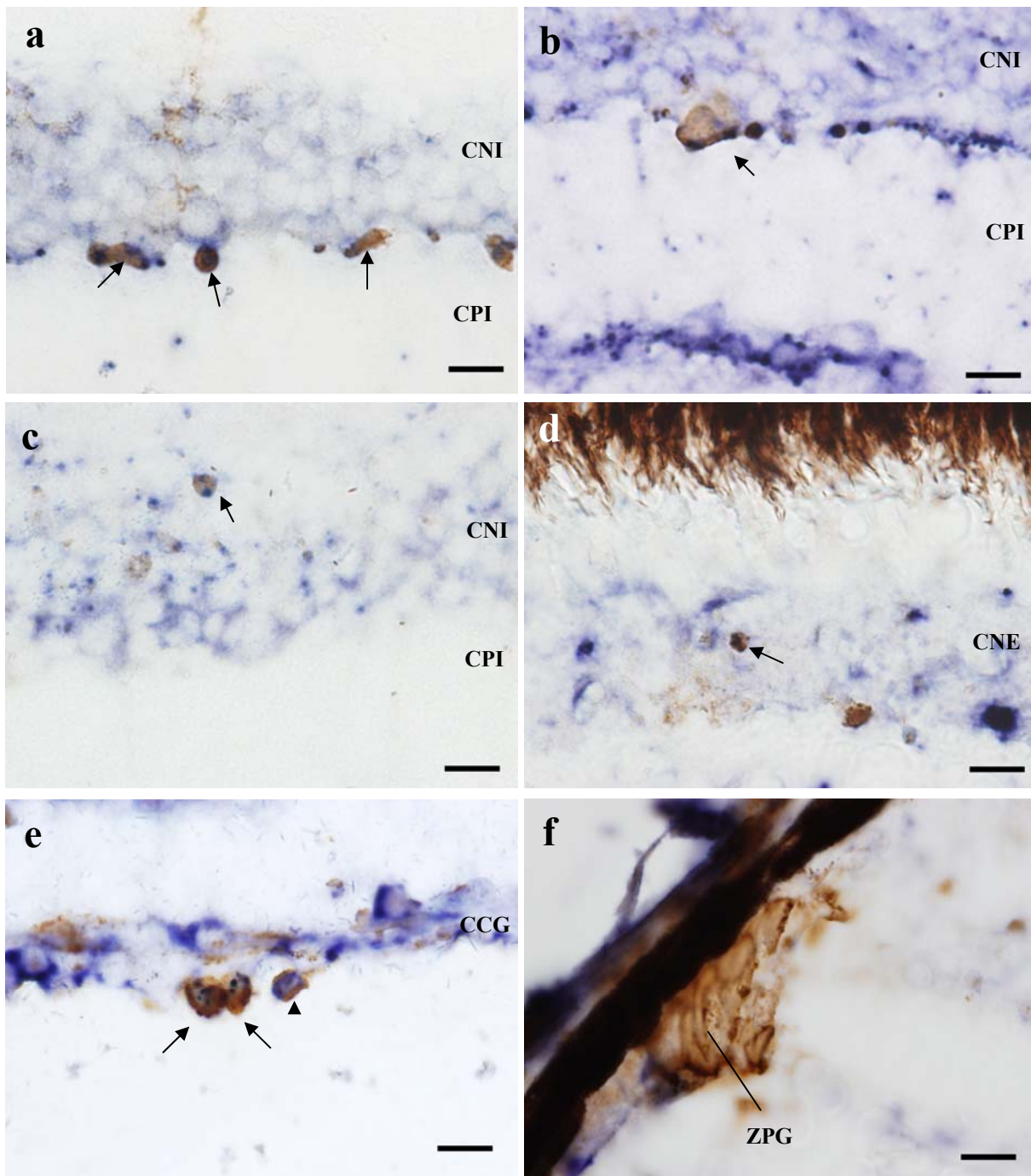


**Fig. 40: Marcaje de Notch1 mediante hibridación *in situ*.** Notch1 se expresa en todas las capas nucleares de la retina. **a)** En la CNI las células positivas se distribuyen principalmente en zonas vitreales y centrales, aunque también se observan núcleos marcados en regiones esclerales (flecha). **b)** Algunos núcleos marcados situados en el límite de la CNI y la CPI. Esta región se ve aumentada en el inserto superior. **c y d)** En la región de la CNE adyacente a la periferia hay núcleos intensamente marcados (recuadro), mientras que en zonas más centrales se ve una única hilera de núcleos marcados en la zona próxima al epitelio pigmentario. Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$  en **a**, **b** y **d**; 10  $\mu\text{m}$  en inserto en **b**; 40  $\mu\text{m}$  en **c**.



**Fig. 41: Expresión de Notch1 (en azul) e inmunohistoquímica contra BrdU (en marrón).** **a)** En la CCG se distinguen dos tipos de núcleos positivos a Notch1, núcleos grandes e intensamente marcados (flecha) y núcleos más pequeños con marcaje más débil (cabeza de flecha). **b)** Núcleo positivo para Notch1 localizado en CPI (flecha). **c)** En la periferia de la retina, la ZPG y la ZT son negativas para Notch1, sin embargo sí se observa expresión de este marcador en el MC. **d-f)** Núcleos positivos a Notch1 en la CNO que se disponen en hileras perpendiculares a la laminación de la retina. Tanto en la CNO (inserto en **e**) como en el NO (flecha en **f**) hemos observado núcleos positivos a Notch1 que además han incorporado BrdU. Barra de escala: 10  $\mu$ m en **a**, **b**, **f** e inserto en **e**; 20  $\mu$ m en **c**, **d** y **e**.



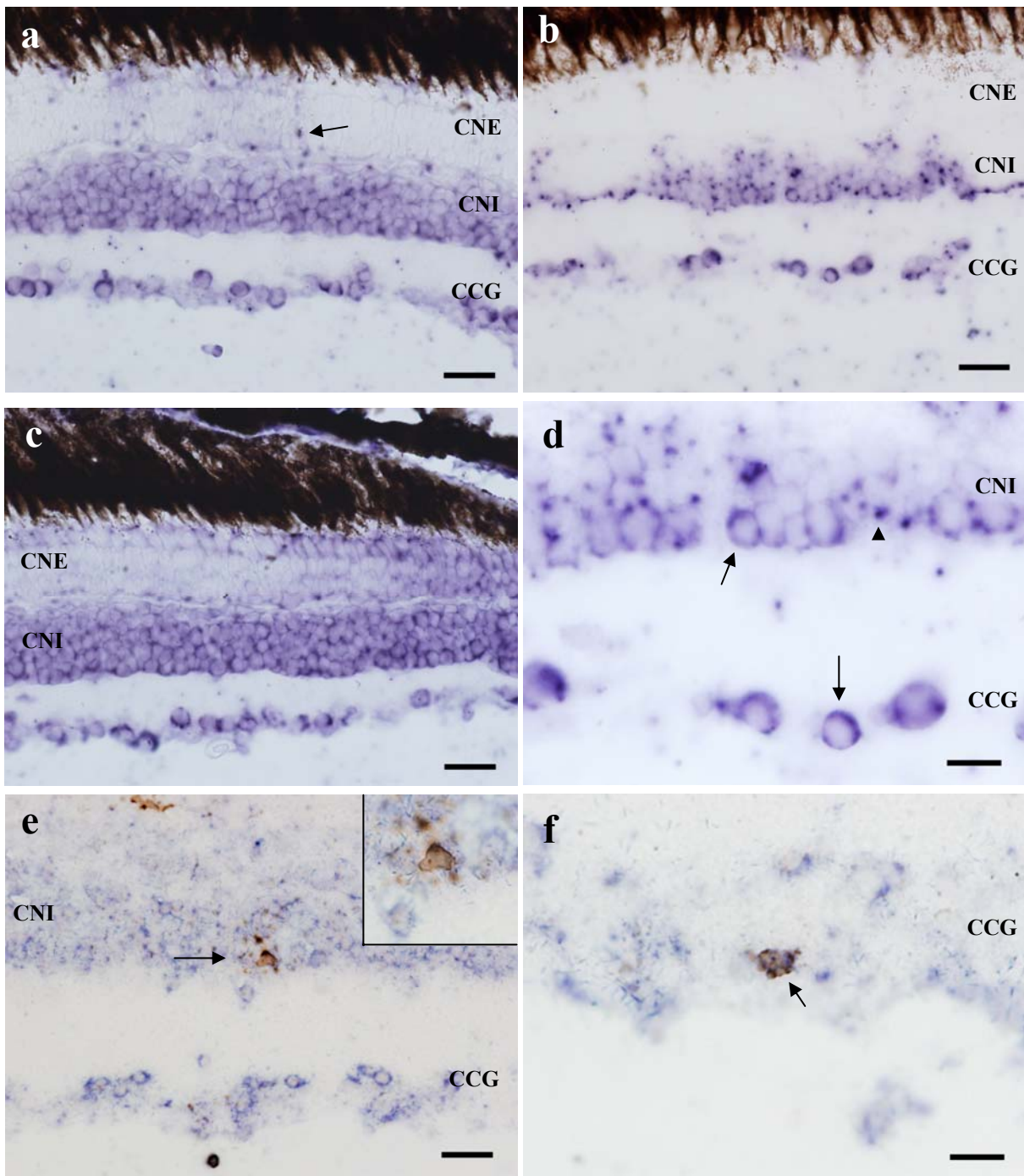


**Fig. 42: Expresión de Notch1 (en azul) e inmunohistoquímica contra BrdU (en marrón).** a-c) En la CNI hay núcleos doblemente marcados para BrdU y Notch1 en la zona vitreal y central de la capa (flechas). d) Núcleo Notch1 y BrdU positivo (flecha) localizado en la región central de la CNE. e) En la CCG se distinguen dos tipos de núcleos positivos que colocalizan ambos marcadores: núcleos grandes e intensamente marcados (flechas) y núcleos más pequeños y débilmente marcados (cabeza de flecha). f) La ZPG es positiva para BrdU, pero en cambio no expresa Notch1. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

### 4.3.2 NeuroD

La expresión de NeuroD se localiza en las tres capas nucleares de la retina (Fig. 43a-d). En la CNI los núcleos positivos se distribuyen por todo el espesor de la capa, aunque su densidad disminuye en la zona más escleral (Fig. 43b). Dichos núcleos poseen una morfología redondeada en las zonas vitreales y centrales, y más fusiforme en el límite con la CPE (Fig. 43a, c). El marcaje se localiza formando un anillo alrededor del núcleo, aunque en algunos casos también se observan pequeños agregados dentro del núcleo (Fig. 43b, d). En la CNE la expresión de NeuroD es muy variable, así mientras que en la retina central encontramos pequeños gránulos marcando algunos núcleos aislados (Fig. 43a), en la retina madura adyacente a la periferia observamos una gran densidad de núcleos positivos a NeuroD (Fig. 43c). En la CCG se distinguen núcleos grandes, redondeados e intensamente marcados para NeuroD (Fig. 43d).

Las células que colocalizan BrdU y NeuroD se sitúan principalmente en la CNI y en la CCG (Fig. 43e, f). En la CNI los núcleos doblemente marcados se localizan en las regiones centrales y esclerales de capa (Fig. 43e). En la CNE resulta muy complicado identificar núcleos positivos a ambos marcadores, ya que la intensidad del marcaje para NeuroD es más débil que en el resto de capas y queda oculto bajo el precipitado de DAB.



**Fig. 43: Expresión de NeuroD e incorporación de BrdU.** a y b) Expresión de NeuroD en las tres capas nucleares, aunque en la CNE es donde se observa menor densidad de núcleos marcados (flecha en a). c) En la región periférica, la CNE muestra un aumento de expresión de NeuroD y se ven numerosos núcleos positivos para este marcador. d) El marcaje en la CNI y en la CCG se distribuye en forma de anillo en la periferia del núcleo (flechas) o en pequeños granulos dentro del núcleo (cabeza de flecha). e y f) Colocalización de BrdU y NeuroD en núcleos de la CNI (flecha e inserto en e) y de la CCG (flecha en f). Barra de escala: 20  $\mu$ m en a, b, c y e; 10  $\mu$ m en d, f e inserto en e.

## 4.4 Estudios *in vitro* de las células progenitoras de bastón

Los teleósteos son un modelo de experimentación cada vez más utilizado para la caracterización de progenitores neurales en la retina. Sorprendentemente, no existe ningún protocolo óptimo para el cultivo de células progenitoras adultas de dichas especies. Por ello, nos hemos centrado en la puesta a punto de un protocolo que nos permita realizar cultivos estables de progenitores neurales.

### 4.4.1 Optimización del protocolo de cultivo

Para la realización de un cultivo primario debemos tener en cuenta varios factores que pueden afectar al crecimiento y a la viabilidad de las células. Las condiciones óptimas de un cultivo primario dependerán del organismo, del tejido de origen y del tipo celular a cultivar, ya que probablemente necesitarán requerimientos nutricionales y ambientales diferentes. Como consecuencia de la falta de estudios sobre cultivos de células progenitoras de peces adultos, no existen datos previos sobre las condiciones necesarias para el cultivo de dichos progenitores en el carpín.

Por todo ello, hemos tenido que determinar y poner a punto cada una de las variables que pueden afectar a nuestro cultivo:

**Temperatura:** La temperatura tiene gran influencia en la tasa de crecimiento de las células, de ahí la importancia de un buen control de la misma. Además, ésta influye en el pH del medio. La mayor parte de los cultivos primarios se realizan en mamíferos y por ello la temperatura utilizada es de 37°C. En peces se han realizado cultivos de explantes de pez cebra (Tomizawa *et al.*, 2001; Kustermann *et al.*, 2008) y cultivos primarios de pez cuchillo (Hinsch y Zupanc, 2006). En ambos casos la temperatura utilizada en el cultivo coincidía con la temperatura corporal del pez, 28,5°C para el pez cebra y 24-28°C para el pez cuchillo. Teniendo en cuenta que la temperatura corporal del carpín es de 20°C, hemos realizado cultivos primarios a tres temperaturas diferentes:

37°C: Es la más común y todos los productos comerciales han sido comprobados para dicha temperatura, sin embargo está muy alejada de la temperatura corporal del carpín.

28,5°C: Es la temperatura corporal del pez cebra y se han descrito cultivos primarios estables de células diferenciadas a dicha temperatura.






## Resultados

20°C: Es la temperatura corporal del carpín y en principio parece la más adecuada para realizar los cultivos. Los principales inconvenientes son que los incubadores estándar no alcanzan esta temperatura y que el pH de los medios de cultivo es más inestable.

Para los dos primeros grupos experimentales (37°C y 28,5°C) utilizamos incubadores normales. Sin embargo, para el grupo de 20°C tuvimos que usar una estufa refrigerada. Dichas estufas no tienen sistema de inyección de CO<sub>2</sub>, por lo cual diseñamos un sistema compuesto por una cámara de incubación conectada a una bala de CO<sub>2</sub> al 5%. De esta manera mantuvimos la temperatura a 20°C y la concentración de CO<sub>2</sub> estable.

Para determinar la temperatura óptima en el cultivo de progenitores de bastón hemos utilizado los medios de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) y Ham's F12 suplementado, ya que son los medios más utilizados en cultivos de peces (Tomizawa *et al.*, 2001; Hinsch y Zupanc, 2006; Kustermann *et al.*, 2008) y son los recomendados para cultivar líneas celulares y embriones de pez cebra.

En todos los casos el pH del medio se mantuvo estable, con una concentración del 5% de CO<sub>2</sub>. A una temperatura de 37°C las células morían durante las primeras 24 horas. A 28,5°C las células se mantenían vivas, pero en ningún caso observamos proliferación. El mejor resultado lo obtuvimos con la temperatura de 20°C, ya que a los 5 primeros días se observaban pequeñas neuroesferas primarias (Tabla 6).

	1ª semana	2ª semana
37°C		
28,5°C		
20°C		

**Tabla 6:** Resultados obtenidos en los cultivos primarios en función del rango de temperatura utilizada.

**pH:** El pH óptimo de crecimiento para la mayoría de tipos celulares es de 7,4, aunque existen pequeñas variaciones dependiendo del cultivo. El pH del medio depende directamente de la temperatura y de la concentración de CO<sub>2</sub>, por tanto, es necesario seleccionar adecuadamente ambas variables.

El pH óptimo para el crecimiento de nuestras células está entre 7,3 y 7,4, ya que este ha sido el rango en donde mayor tasa de crecimiento hemos observado.



**CO<sub>2</sub>:** El CO<sub>2</sub> juega un complejo papel en el medio debido a que influye en el pH.

Algunas de las reacciones que tienen lugar en el medio son:



El incremento de la concentración de ión bicarbonato desplaza la ecuación hacia la izquierda, de modo que el pH se establezca en 7,4. Para establecer un pH determinado se deben tener en cuenta los niveles de bicarbonato sódico y la tensión de CO<sub>2</sub>. En la mayoría de los medios de cultivo comerciales se recomienda 5% de CO<sub>2</sub> para una temperatura de 37°C. A pesar de que, como hemos indicado en apartados anteriores, el pH se mantiene estable a 20°C y con 5% de CO<sub>2</sub>, quisimos comprobar si a esa temperatura el aporte de CO<sub>2</sub> era realmente necesario para mantener el pH, ya que de ese modo podríamos simplificar el protocolo y utilizar únicamente una estufa para mantener la temperatura adecuada. Por ello, realizamos cultivos celulares sin aporte externo de CO<sub>2</sub>. A los pocos minutos de sembrar las células ya observamos como el color del medio viraba considerablemente de un rojizo-anaranjado a morado. Sin aporte externo de CO<sub>2</sub> el pH del cultivo era de 8.5 y en estas condiciones las células morían a las pocas horas. Por tanto, el medio de cultivo a 20°C solamente se mantiene estable cuando aportamos una concentración de 5% de CO<sub>2</sub>.

**Disgregación tisular:** La disociación tisular consiste en separar las células entre si y de su sustrato, manteniendo la viabilidad celular. Para conseguirlo es necesario romper la red de proteínas que constituye la matriz extracelular que las mantiene unidas. Es un proceso muy delicado, ya que si disgregamos demasiado tendremos mucha muerte celular y si la disociación es muy suave quedarán agregados celulares que acabaran muriendo también. Generalmente los métodos empleados se pueden clasificar en tres categorías:

- Mecánicos: Disgregar el tejido con una pipeta.
- Químicos: Adición de soluciones en las que no hay iones divalentes o sus agentes quelantes, desestabilizando así las uniones de las proteínas de la matriz extracelular.
- Enzimáticos: Tratamiento del tejido con soluciones de proteasas activas (colagenasa, dispasa, tripsina, elastasa, papaína, pronasa, hialuronidasa, etc...). La elección de las enzimas dependerá del tejido que queramos disgregar.

En la práctica se suelen emplear técnicas que combinan dos o tres métodos diferentes. La elección de un procedimiento u otro dependerá fundamentalmente de la naturaleza y cantidad de tejido disponible. Para disgregar las retinas de carpín hemos probado tres combinaciones diferentes:

## Resultados

---

Disgregación enzimática: Incubamos las retinas con una mezcla de enzimas denominada PDD (ver apartado 3.8.1) durante 20 minutos en un baño a 37°C.

Disgregación mecánica: Las retinas se disociaron con una pipeta durante 15 minutos.

Disgregación enzimática/mecánica: Las retinas se incubaron con la solución PDD dos veces, 5 minutos cada vez a 37°C. Tras cada incubación realizamos una disociación mecánica con una pipeta durante 5 minutos.

Tras las disociaciones estudiamos la viabilidad celular por el método de exclusión del azul tripán. Este es un colorante vital que no atraviesa la membrana plasmática de las células vivas, pero sí la de las células muertas. Tras realizar los tres tipos de disgregación obteníamos una alta viabilidad celular. Sin embargo, en el caso de la disgregación enzimática o mecánica, independientemente, observamos numerosos agregados celulares que no se habían disociado correctamente. Por tanto, el método de disgregación más eficaz fue el que combinaba disociación mecánica y enzimática.

**Medio de cultivo:** El medio de cultivo óptimo es aquel que cumple todos los requerimientos nutricionales que la célula necesita para sobrevivir y dividirse. Actualmente existen numerosos medios de cultivo comerciales, con composiciones específicas para cada tipo celular. Estos medios suelen suplementarse con factores de crecimiento, aminoácidos, vitaminas, glucosa, hormonas, suplementos comerciales, etc.

En la literatura se han descrito numerosos medios de cultivo suplementados para hacer crecer progenitores neurales. En peces, se ha utilizado principalmente DMEM/F12 suplementado con B27 o con suero (Tomizawa *et al.*, 2001; Hinsch y Zupanc, 2006; Kustermann *et al.*, 2008). En nuestro estudio hemos utilizado dos medios de cultivo comerciales diferentes:

- Neurobasal A:** Se utiliza principalmente en cultivos primarios de progenitores neurales, ya sean de origen embrionario o adulto. Es un medio libre de suero y de ácido glutámico y aspártico. Se recomienda suplementarlo con el complemento B27 y L-glutamina. La composición exacta del medio no ha sido publicada por la casa comercial.

- DMEM/F12:** Es uno de los medios más utilizados en cultivos celulares. Su uso está recomendado para líneas celulares de pez cebra.

Realizamos cultivos celulares utilizando tres composiciones de medios de cultivo diferentes para seleccionar aquel que proporcionara la mayor tasa de supervivencia y de proliferación celular. Los tres medios de cultivo utilizados se obtuvieron añadiendo

diferentes suplementos a los dos medios comerciales, DMEM/F12 y Neurobasal A (Tabla 7). Utilizando como base el medio DMEM/F12 hicimos dos medios distintos: uno enriquecido denominado DMEM/F12 suplementado, que fue el utilizado para establecer la temperatura óptima, y otro más pobre denominado DMEM/F12 modificado. El medio Neurobasal A enriquecido se denominó Neurobasal A suplementado.

Los tres medios fueron suplementados con antibióticos, penicilina y estreptomina, y con un antifúngico, anfotericina B, para disminuir la posible contaminación del cultivo. Además, añadimos factores de crecimiento para promover la proliferación celular e impedir que las células se diferencien. Los factores más utilizados en cultivos de células progenitoras son el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Se ha demostrado que estos factores promueven la proliferación de los progenitores retinianos y la supervivencia los bastones (Anchan *et al.*, 1991; Hicks y Courtois 1992; Lillien y Cepko 1992).

Otro componente muy utilizado en cultivos celulares es el suero, que aporta numerosos compuestos necesarios para la supervivencia celular. Sin embargo, se ha descrito que en cultivos de progenitores retinianos la ausencia de suero promueve el estado indiferenciado de las células (Akagi *et al.*, 2003; Angenieux *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2004; Klassen *et al.*, 2004). Por ello, en cultivos primarios se suele sustituir el suero por proteínas y poliaminas (albúmina bovina, transferrina y putresceína) o por suplementos comerciales. Dichos suplementos tienen ya incluidos muchos de los componentes necesarios para el cultivo. Uno de los más utilizados es el B27, que está compuesto entre otras sustancias por vitaminas, hormonas, insulina y transferrina. La composición de los tres medios utilizados se indica en la Tabla 7.



## Resultados

		DMEM/F12 suplementado	DMEM/F12 modificado	NEUROBASAL A suplementado
Glucosa		3 µg/ml		
Piruvato		100mM		
Factores de crecimiento	EGF	20 ng/ml	20 ng/ml	20 ng/ml
	FGF	20 ng/ml	20 ng/ml	20 ng/ml
Antibióticos	Penicilina	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml
	Estreptomicina	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml
Antifúngico	Anfotericina B	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
Suplemento comercial	B27			20µl/ml
Putresceína		60 mM		
Transferrina		30 mg/ml		
L-glutamina		200 mM	200 mM	200 mM
Progesterona		100 µM		
Selenito sódico		150 µM		
Heparina				2 µg/ml
Insulina		10 mg/ml		

**Tabla 7:** Composición de los medios de cultivo utilizados.

Uno de los problemas que nos encontramos al realizar cultivos primarios de retina de carpín fue la contaminación. En el ojo del carpín, los humores vítreo y acuoso están contaminados por bacterias, lo que hace prácticamente imposible no tener contaminación inicial en el cultivo. A pesar de realizar pretratamientos con colorantes orgánicos y de añadir antibióticos y antimicóticos al cultivo, no conseguíamos eliminar la contaminación. Por ello, tuvimos que tratar el cultivo con antibióticos más específicos. Utilizamos tres antibióticos de amplio espectro: vancomicina, gentamicina y ciprofloxacino. Además de probar cada antibiótico por separado, hicimos una prueba conjunta con vancomicina y gentamicina ya que sus espectros de acción se complementan.

Mientras que con la vancomicina y la gentamicina, ya sea independientemente o de forma conjunta, sólo se veían afectadas algunas subpoblaciones bacterianas, con el ciprofloxacino conseguimos controlar la contaminación y tras tres semanas de tratamiento el cultivo estaba libre de contaminación (Tabla 8). Además, ni la tasa de supervivencia ni la de proliferación celular se veían afectadas por la concentración utilizada de ciprofloxacino.









	1ª semana	2ª semana	3ª semana
<b>Vancomicina</b> (20 µg/ml)	+ +	+ +	+ + +
<b>Gentamicina</b> (5 µg/ml)	+ +	+ +	+ + +
<b>Vancomicina + gentamicina</b>	+ +	+ +	+ +
<b>Ciprofloxacino</b> (4 µg/ml)	+ +	+	

**Tabla 8:** Grado de contaminación tras el tratamiento con los diferentes antibióticos.

La eficacia de los diferentes medios se estableció de acuerdo con dos factores: la tasa de supervivencia de las células y su tasa de crecimiento. En todos los cultivos se mantuvieron las condiciones de temperatura y CO<sub>2</sub> descritas en apartados anteriores. Utilizando el medio DMEM/F12 modificado obtuvimos los peores resultados, en sólo tres días todas las células habían muerto. Ello demuestra que este medio es demasiado pobre para sustentar el crecimiento de las células progenitoras de bastón.

Si utilizamos el medio DMEM/F12 suplementado obteníamos un cultivo estable y en la primera semana ya podíamos observar pequeñas neuroesferas (Tabla 9). Sin embargo, tras dos semanas de cultivo la tasa de crecimiento disminuyó, hasta que llega a pararse completamente a las tres semanas. A pesar de que los progenitores neurales no morían, tampoco proliferaban. Utilizando el medio Neurobasal A suplementado en los primeros días del cultivo, obtuvimos los mismos resultados que con el medio DMEM/F12 suplementado. Sin embargo, con este medio de cultivo la tasa de proliferación no disminuía y tras realizar varias disgregaciones obtuvimos neuroesferas secundarias, terciarias, y así sucesivamente. Si empleamos dicho medio, el cultivo celular se mantiene estable más tiempo así como la tasa de crecimiento (Tabla 9).

## Resultados

	1ª semana	2ª semana	3ª semana
<b>DMEM/F12 suplementado</b>			
<b>DMEM/F12 modificado</b>			
<b>Neurobasal A suplementado</b>			 

**Tabla 9:** Resultados obtenidos con los diferentes medios de cultivo.

A pesar de que el medio de cultivo DMEM/F12 es el más utilizado en cultivo de progenitores neurales, en nuestro tejido no ha dado los resultados esperados. En consecuencia nos preguntamos si la diferente efectividad de ambos medios podría deberse a variaciones en la concentración de algún compuesto. Se ha descrito que bajo ciertas condiciones la L-glutamina puede resultar tóxica y por ello en muchos casos se utilizan complementos comerciales que disminuyen este riesgo. Es posible que la mayor concentración de L-glutamina en el medio DMEM/F12 suplementado esté afectando a la proliferación celular y provoque la disminución del crecimiento. Por ello realizamos de nuevo los cultivos celulares, pero esta vez sin añadir a ninguno de los tres medios L-glutamina. En ninguno de los casos se observó proliferación ni neuroesferas, y pasados unos días las células morían. Por tanto, la L-glutamina no solo no es tóxica sino que es necesaria para la proliferación de nuestras células.

Tras poner a punto el protocolo para cultivar progenitores de bastón de retina adulta, realizamos cultivos celulares y en cada cambio de medio aprovechamos para estudiar la evolución del cultivo. Para mantener la tasa de proliferación constante y renovar el medio de cultivo, realizamos un cambio de medio cada 3-4 días. A partir de la primera semana en cada renovación de medio realizamos una disgregación suave para disociar las neuroesferas y facilitar su proliferación.

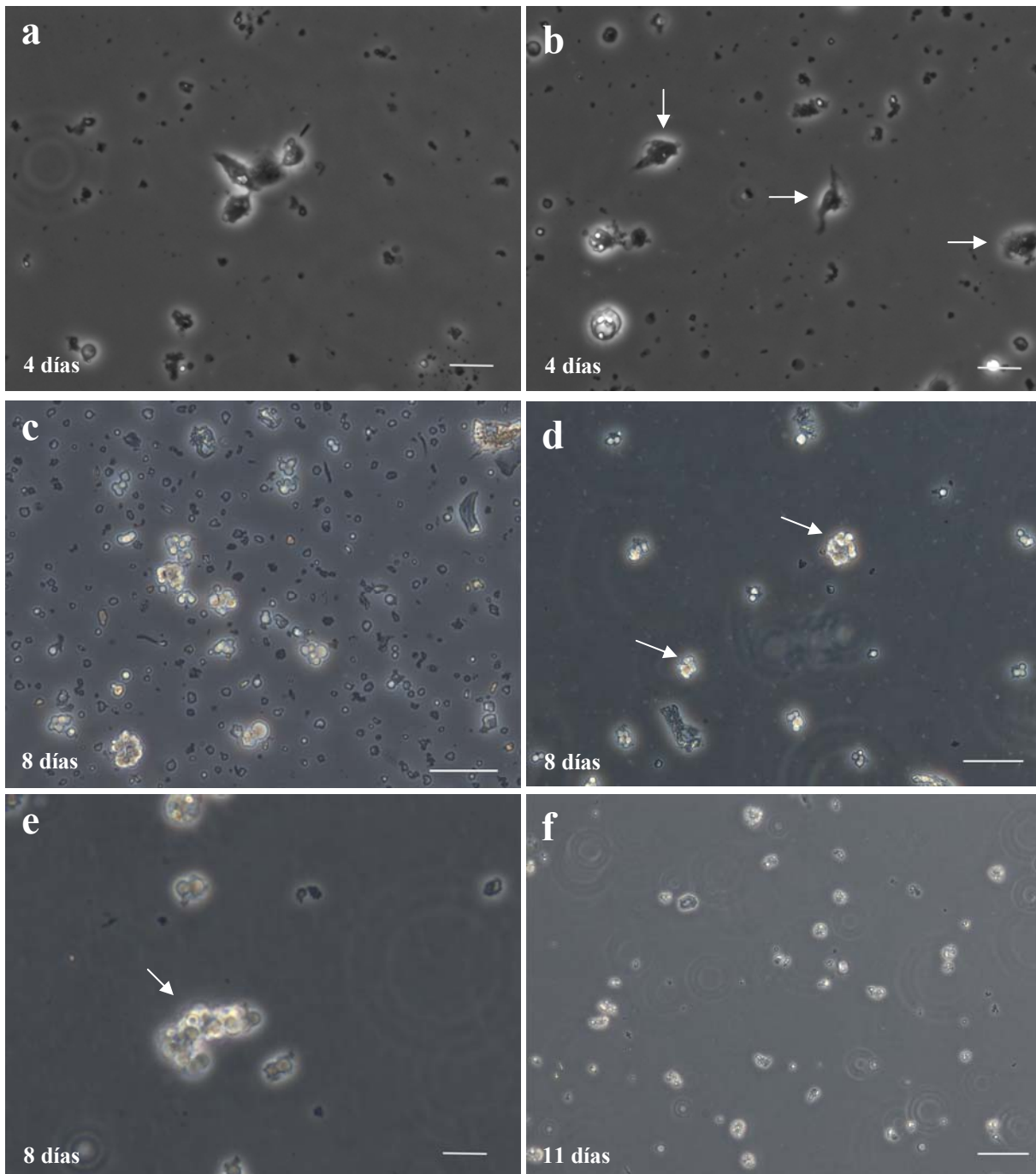
El primer cambio de medio se realizó a los 4 días de sembrar las células. En esta etapa la mayoría de las células estaban aisladas o formando pequeños grupos de 2 ó 3 células y aunque había algunos agregados de mayor tamaño, estos eran muy escasos. El cultivo presentaba un aspecto muy sucio con muchos restos celulares, con contaminación bacteriana y en algunos casos observamos esporas sin germinar. En las placas que desecharon tras el

cambio de medio, había células diferenciadas adheridas al fondo de la placa (Fig. 44a, b). La morfología de dichas células variaba, pero en general eran fusiformes (Fig. 44b), y se disponían tanto de forma aislada (Fig. 44b) como estableciendo contactos con otras células (Fig. 44a).

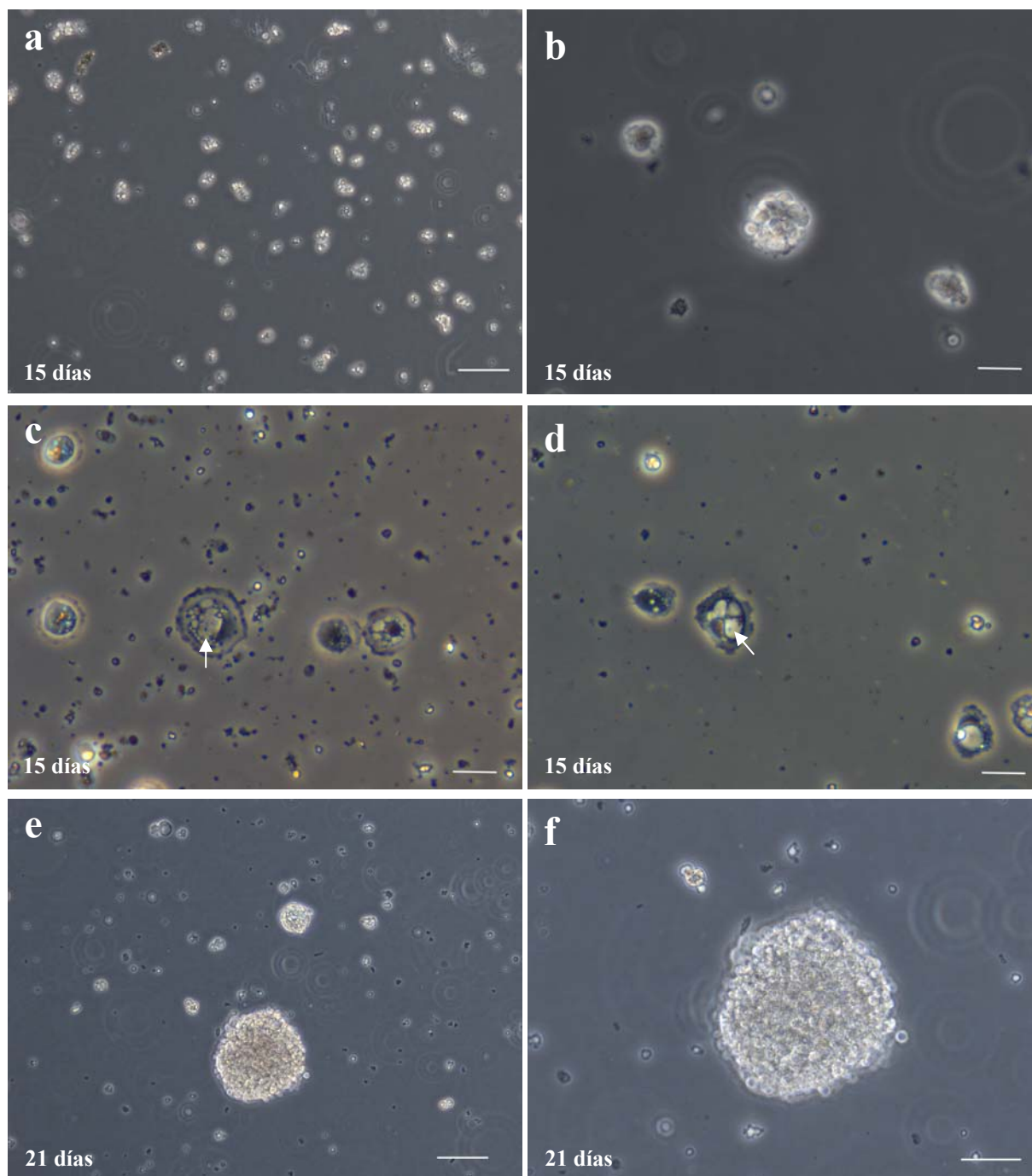
A los ocho días realizamos un cambio de medio. El cultivo todavía presentaba numerosos restos de células muertas y continuaba con contaminación bacteriana, aunque en menor grado (Fig. 44c). En esta etapa ya observamos las primeras neuroesferas compuestas por 5-6 células (Fig. 44c-e). Cuando hacíamos el cambio de medio prácticamente no encontramos células diferenciadas adheridas a la placa.

Once días después de empezar el cultivo hicimos otro cambio de medio. El número de neuroesferas que se observaba era mayor con respecto al cambio de medio anterior y el cultivo mostraba mejor aspecto (Fig. 44f). La contaminación bacteriana era muy baja y casi no quedaban restos de células muertas. En el cuarto cambio de medio (15 días) el cultivo estaba prácticamente compuesto en su totalidad por neuroesferas (Fig. 45a,b), y apenas quedaban restos de contaminación. Las células diferenciadas que se observaron adheridas a la placa tras el primer pase se mantuvieron con medio Neurobasal A suplementado sin factores de crecimiento. A los 15 días de cultivo el aspecto de las células adheridas había cambiado radicalmente, ya que presentaban mayor tamaño y una morfología redondeada. Además, su citoplasma contenía estructuras vacuoladas que parecen contener bacterias en su interior (Fig. 45c, d). El grado de complejidad varía de una célula a otra, ya que encontramos células con numerosas vacuolas de pequeño tamaño y otras con menor número pero de mayor tamaño.

En los cambios de medio sucesivos, tanto el número como el tamaño de las neuroesferas aumentaban. A las tres semanas de realizar el cultivo consideramos que el mismo está compuesto únicamente por células progenitoras de bastón, ya que, en ningún caso observamos células adheridas al sustrato y todas las células del cultivo están formando neuroesferas (Fig. 45e, f).



**Fig. 44: Evolución del cultivo celular desde la primera a la segunda semana.** a y b) Cuatro días después de realizar el cultivo se ven células diferenciadas adheridas a la placa. Pueden distribuirse de forma aislada (flechas en b) o formando grupos (a). c-e) Cultivos celulares de 8 días. Varias neuroesferas muy brillantes y numerosos restos celulares. Se ven las primeras neuroesferas (flechas en d), aunque su tamaño es variable. Además, hay agregados de neuroesferas (flecha en e). f) A medida que avanza el cultivo la densidad de neuroesferas aumenta. Barras de escala: 20  $\mu\text{m}$  en a, b y e; 50  $\mu\text{m}$  en c y d; 100  $\mu\text{m}$  en f.



**Fig. 45: Evolución del cultivo de la segunda a la tercera semana.** **a)** A los 15 días el número de neuroesferas del cultivo aumenta considerablemente respecto a los 11 días. **b)** Neuroesfera en un cultivo celular de 15 días. **c** y **d)** Las células diferenciadas adheridas al sustrato modifican su morfología y presentan vacuolas que contienen bacterias (flechas). **e)** A los 21 días ya se observan neuroesferas de gran tamaño. **f)** Aumento de la neuroesfera de la imagen e. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$  en **a** y **e**; 20  $\mu\text{m}$  **b**, **c** y **d**; 50  $\mu\text{m}$  en **f**.

## Resultados

**Sustratos de adhesión celular y diferenciación:** Tras haber conseguido un cultivo estable de progenitores de bastón, el siguiente paso fue intentar caracterizar dichas células. En primer lugar disgregamos las neuroesferas y hacemos que las células se adhieran a un sustrato, de este modo conseguiremos que los progenitores comiencen a diferenciarse. Los progenitores de bastón no son células adherentes, ya que en el cultivo se encuentran siempre en flotación. Para facilitar la adhesión celular hay que tratar la superficie donde se van a sembrar las células con diferentes compuestos como poliaminoácidos (poliornitina, poli-lisina) o proteínas de la matriz extracelular (laminina, fibronectina).

Para determinar qué compuestos son los más efectivos para facilitar la adhesión celular de los progenitores de bastón, sembramos las células en cubreobjetos tratados con poliornitina y fibronectina o poliornitina y laminina (Tabla 10). Las células con medio Neurobasal A suplementado sin factores de crecimiento se dispusieron en placas con cubreobjetos tratados con las dos combinaciones, y se mantuvieron a 20°C durante una semana. En ningún caso observamos células adheridas. Para facilitar aún más la adhesión realizamos el mismo experimento añadiendo un 5% de suero fetal bovino, que se ha descrito que promueve la diferenciación y la adhesión celular. Tampoco se observaron células adheridas al sustrato. Existe la posibilidad de que la adhesión celular esté limitada, no solo por los sustratos, sino también por la temperatura. A 20°C los compuestos comerciales utilizados para la adhesión parecen no funcionar. Por ello, repetimos el experimento con y sin suero y subiendo la temperatura. En ningún caso hemos conseguido resultados positivos en la adhesión celular (Tabla 10).

	20°C	28,5°C
<b>Poliornitina + Laminina</b>	-	-
<b>Poliornitina + Fibronectina</b>	-	-
<b>Poliornitina + Laminina + 5% Suero</b>	-	-
<b>Poliornitina + Fibronectina + 5% Suero</b>	-	-

**Tabla 10:** Resultados obtenidos con los diferentes sustratos de adhesión celular.

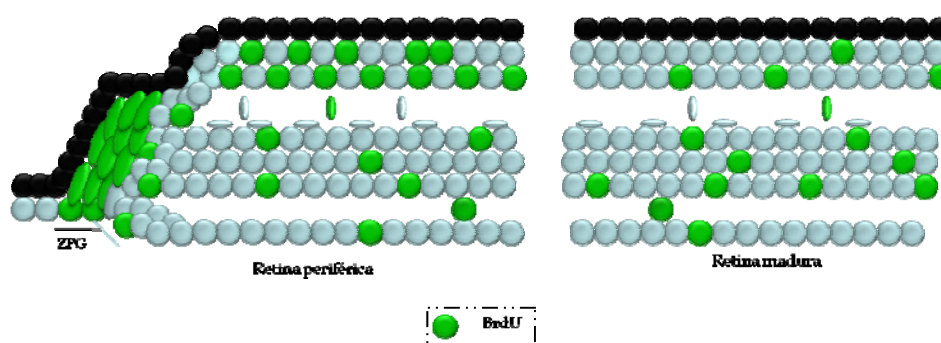
# Discusión

---



## 5.1 Proliferación celular en la retina adulta

La incorporación de BrdU al núcleo de las células proliferativas nos ha permitido distinguir dos poblaciones de progenitores neurales en la retina adulta de carpín (Fig. 46). En la periferia de la misma observamos un grupo de células progenitoras con morfología fusiforme y con una alta tasa proliferativa. Dicho grupo constituye la ZPG, un remanente del neuroepitelio embrionario que es el responsable del crecimiento continuado de la retina. Nuestros resultados se corresponden con lo descrito en otras especies de teleósteos (*trucha*: Lyall, 1956, Schmitt y Kunz, 1989, *carpín*: Johns y Easter, 1977; Meyer, 1978; *carpa*: Kock, 1982; Negishi *et al.*, 1985; *Cíclido*: Mack *et al.*, 2003; *pez cebra*: Raymond *et al.*, 2006).



**Fig. 46:** Esquema de la incorporación de BrdU en la retina.

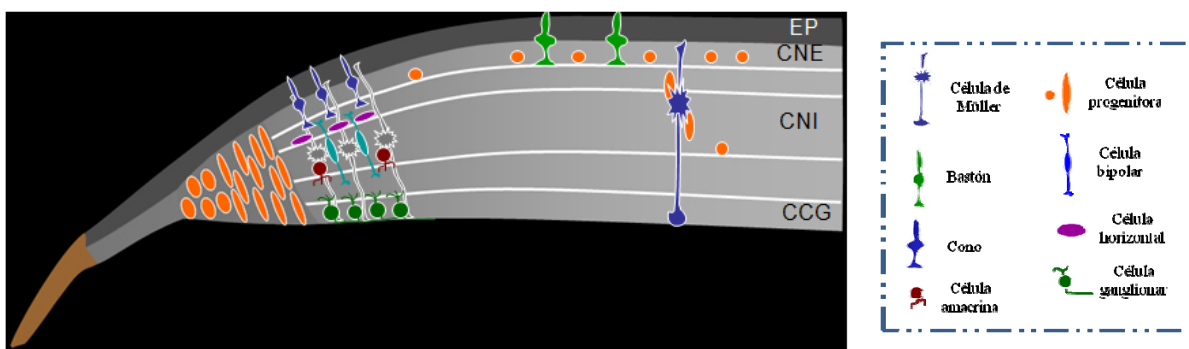
La segunda región de proliferación se localiza en la retina madura y lo componen las células del linaje de bastón. Dichos progenitores son los encargados de generar bastones en una retina madura intacta, y ante una lesión son capaces de regenerar el tejido formando todos los tipos celulares retinianos (Otterson *et al.*, 2001). Hemos identificado células pertenecientes al linaje de bastón en las capas esclerales de la retina, la CNI, la CPE y la CNE. Según su localización en la retina, su morfología nuclear y su tasa de proliferación podemos distinguir hasta tres subtipos de células progenitoras de bastón (Fig. 46). En la CNI hemos observado dos tipos de núcleos positivos a BrdU, en la zona vitreal los núcleos son redondeados y su número es escaso, y las hemos identificado como células madre de la CNI. En regiones centrales y esclerales de la CNI y en la CPE los núcleos poseen una morfología fusiforme perpendicular a la laminación de la retina, y se corresponderían con los progenitores en migración. En la CNE los precursores de bastón poseen tanto morfología redondeada como fusiforme y aunque los núcleos se disponen por toda la capa su densidad es mayor en la región vitreal. Nuestros datos coinciden con estudios previos realizados en

## Discusión

salmónidos (*Onchorynchus mykiss*: Julian *et al.*, 1998; *Salmo trutta fario*: Candal *et al.*, 2005), en carpín (*Carasiuss auratus*: Otteson *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001) y en pez cebra (Raymond *et al.*, 2006).

En la retina de carpín también vemos células proliferativas en la CPI y la CCG (Fig. 46), sin embargo estas células no se corresponderían con progenitores neurales, sino con células gliales, ya que en esta región las únicas células con capacidad proliferativa son las de estirpe glial.

Los datos obtenidos en el presente trabajo, junto con los resultados descritos en la literatura, nos permiten realizar un esquema general común sobre el comportamiento de las células del linaje de bastones en teleósteos (Fig. 47). En la región vitreal de la CNI se localizan células progenitoras inmaduras con morfología redondeada que poseen características de célula madre, ya que se dividen de forma asimétrica, su tasa de proliferación es muy baja, expresan Pax6 y se ha demostrado que son capaces de generar todos los tipos retinianos tras una lesión (Weissman, 2000). Cuando estas células se dividen de manera asimétrica forman una célula inmadura que mantendrá la población de células madre de la CNI y una célula progenitora que adquiere morfología fusiforme y comienza a migrar hacia capas esclerales. Estas células utilizan las células de Müller como guía para migrar hasta la CNE. Cuando llegan a esta capa comienzan a dividirse de forma simétrica un número limitado de veces (Otteson *et al.*, 2001), y tras su última división se diferencian a bastones. Se ha descrito que los precursores de bastón localizados en la CNE están comprometidos a bastones y únicamente generarán este tipo celular (Sandy y Blaxter, 1980; Johns, 1982; Mack y Fernald, 1997). Este esquema general concuerda perfectamente con nuestros datos sobre la tasa de proliferación, morfología nuclear y localización de los progenitores de bastón en el carpín (Fig. 46).



**Fig. 47:** Esquema de los progenitores retinianos en la retina de teleósteos.

Sin embargo, hay una excepción a este esquema general, el cíclido *Haplochromis burtoni* que no posee células proliferativas en la CNI (Mack *et al.*, 2003). En esta especie las células más inmaduras se localizan a la altura de la MLE en la CNE, donde se dividen formando progenitores de bastón. Éstos migran hacia zonas vitreales de la CNE donde se diferencian. Existen más divergencias entre las distintas especies de teleósteos, ya que por ejemplo la trucha posee muchos más progenitores en la CNI que el carpín. Se piensa que esto se debe a que la trucha posee un crecimiento más rápido de la retina (Johns, 1982; Julian *et al.*, 1998); así mientras que el carpín necesita dos años para alcanzar 8 centímetros, la trucha sólo tarda ocho semanas.

Además de la distribución por capas de los distintos tipos celulares del linaje de bastón, hemos observado que dichos progenitores no se distribuyen de manera homogénea por toda la retina madura, ya que hay mayor densidad de progenitores en la zona adyacente a la periferia que en regiones centrales (Fig. 46). Estos datos coinciden con lo descrito por otros autores (Johns y Fernald, 1981; Raymond, 1986). Además, se ha demostrado que hay mas células en el lado nasal que en el temporal (Julian *et al.*, 1998). Esto es consistente con los estudios de Easter (1992), que describió que el crecimiento de la retina es asimétrico y que el lado nasal crece mas rápido que el temporal en peces teleósteos.

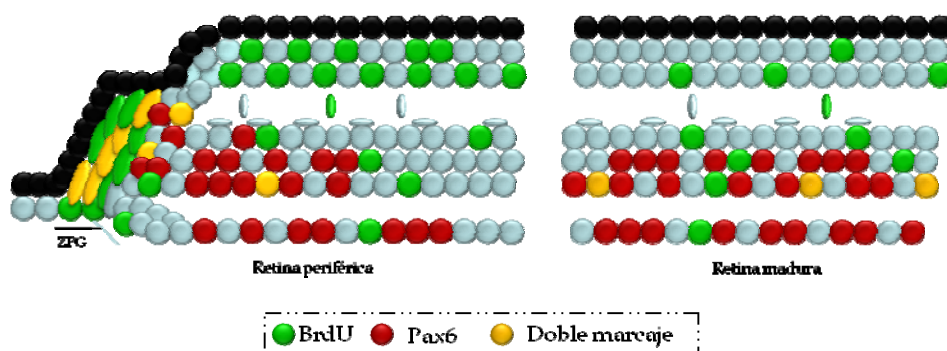
## 5.2 Expresión de marcadores neurales en las células del linaje de bastones

### 5.2.1 Pax6

La expresión de Pax6 en la retina de carpín se localiza principalmente en la CNI y la CCG de la retina madura, y en la región periférica. Sin embargo, la colocalización Pax6 y BrdU está limitada, ya que solo vemos algunos núcleos doblemente marcados en la región vitreal de la CNI y en la zona periférica de la retina (Fig. 48). Pax6 es un factor de transcripción ampliamente analizado durante la retinogénesis (Rio-Tsonis *et al.*, 1995; Altmann *et al.*, 1997; Hirsch y Harris, 1997; Nornes *et al.*, 1998; Kaneko *et al.*, 1999; Ziman *et al.*, 2001; Bäumer *et al.*, 2003), y también se han realizado algunos estudios sobre

## Discusión

su distribución en retina adulta (Hitchcock *et al.*, 1996; Otteson *et al.*, 2001; Faillace *et al.*, 2002).



**Fig. 48:** Esquema de la expresión de Pax6 y su colocalización con BrdU en la retina.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral hemos observado que el mayor número de núcleos Pax6 positivos se localiza en la región vitreal de la CNI (Fig. 48). La variabilidad del tamaño de los mismos y de su intensidad de marcaje hace pensar que Pax6 se encuentra en diferentes subpoblaciones celulares.

La distribución de Pax6 en la CNI de la retina se ha descrito en varias especies de teleósteos (Krauss *et al.*, 1991; Hitchcock *et al.*, 1996; Callaerts *et al.*, 1997; Hirsch y Harris, 1997; Nishina *et al.*, 1999; Otteson *et al.*, 2001; Strickler *et al.*, 2001; Ziman *et al.*, 2001; Faillace *et al.*, 2002). Teniendo en cuenta su localización se considera que las células positivas son células amacrinas. Además, Hitchcock y cols. (1996) localizan dichas células empleando el marcador HPC-1, y las identifican como una subpoblación de células amacrinas. En ocasiones hemos visto núcleos positivos a Pax6 en regiones más esclerales de la CNI. Debido a que estas células no colocalizan con BrdU, deben ser células maduras, y por tanto es probable que se trate de células amacrinas.

También hemos observado núcleos positivos a Pax6 en la CCG (Fig. 48), al igual que se ha descrito en otras especies (Krauss *et al.*, 1991; Hitchcock *et al.*, 1996; Callaerts *et al.*, 1997; Hirsch y Harris, 1997; Nishina *et al.*, 1999; Otteson *et al.*, 2001; Strickler *et al.*, 2001; Ziman *et al.*, 2001; Faillace *et al.*, 2002). Estos núcleos muestran diferente intensidad de marcaje y se han descrito como pertenecientes a células ganglionares y células amacrinas desplazadas (Hitchcock *et al.*, 1996; Otteson *et al.*, 2001).

Se ha comprobado que Pax6 se expresa en los progenitores retinianos desde el inicio hasta el final de la retinogénesis (Krauss *et al.*, 1991; Walther y Gruss, 1991; Püschel *et al.*,

1992; Marquardt *et al.*, 2001), pues es un factor de transcripción necesario para mantener la multipotencialidad de las células progenitoras (Marquardt *et al.*, 2001). Se ha demostrado que Pax6 es responsable de activar los genes *Bhlh* encargados de la determinación de distintos tipos celulares retinianos (Hirsch y Harris, 1997). Todo ello indica que Pax6 se expresa en las poblaciones de retinoblastos que se mantienen en estadios adultos.

Hemos encontrado células proliferativas positivas a Pax6 tanto en regiones periféricas como en zonas maduras de la retina (Fig. 48). En la ZPG observamos núcleos con morfología fusiforme doblemente marcados para Pax6 y BrdU, lo que concuerda con lo descrito en otras especies de teleósteos (Hitchcock *et al.*, 1996; Perron *et al.*, 1998; Kaneko *et al.*, 1999; Fischer y Reh, 2000; Faillace *et al.*, 2002; Kubota *et al.*, 2002). En la ZT los núcleos Pax6 positivos se localizan exclusivamente en la región donde se organiza la CNI, coincidiendo con lo descrito en carpín (Hitchcock *et al.*, 1996). Además, algunas se sitúan en la parte escleral de la CNI; esto podría deberse a que Pax6 se expresa durante la diferenciación de células horizontales, como se ha indicado en algunos estudios (Kawakami *et al.*, 1997; Nishina *et al.*, 1999; de Melo *et al.*, 2003).

En la retina madura, la coexpresión de BrdU y Pax6 se limita exclusivamente a los núcleos redondeados situados en la primera hilera de células de la CNI (Fig. 48). Estos datos coinciden con lo descrito en carpín (Otteson *et al.*, 2001), trucha (Faillace *et al.*, 2002) y pez cebra (Raymond *et al.*, 2006). Estas células doblemente marcadas se corresponden con las células madre de la CNI del linaje de bastón. Son poco numerosas y poseen una tasa de proliferación muy baja. No hemos visto ni precursores de bastón ni progenitores en migración positivos a Pax6, lo que coincide con lo descrito por otros autores (Hitchcock *et al.*, 1996; Otteson *et al.*, 2001; Faillace *et al.*, 2002; Raymond *et al.*, 2006).

En la retina de teleósteos, Pax6 se expresa tanto en la ZPG como en las células madre de la CNI, y su función en ambas zonas parece ser similar, mantener a estas células en un estado inmaduro conservándose así las dos poblaciones de retinoblastos retinianos. Cuando la célula madre de la CNI se divide asimétricamente genera por un lado un progenitor en migración negativo a Pax6 que continuará el linaje de bastón, y una célula madre positiva a Pax6 que mantendrá la población de células inmaduras (Weissman, 2000). Se ha descrito que, aunque Pax6 es el responsable de mantener la multipotencialidad de los retinoblastos, en cuanto los progenitores han adquirido su identidad, Pax6 ya no es necesario para el mantenimiento de la estirpe celular (Marquardt *et al.*, 2001).

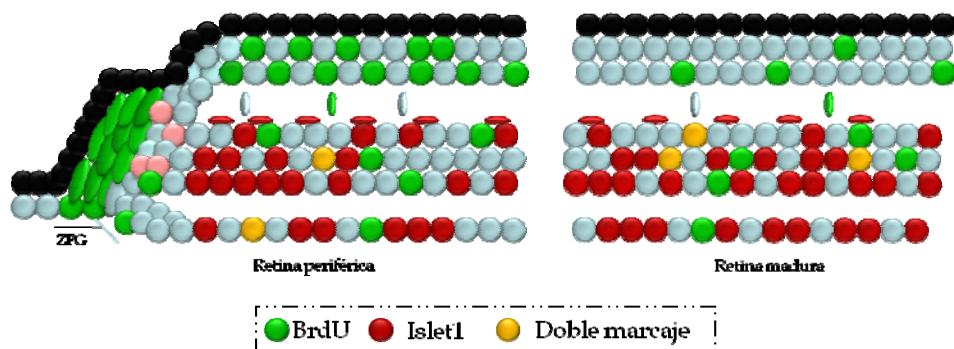
Recientemente se ha descrito una fuente alternativa de progenitores de bastón, las

células de Müller (Bernardos *et al.*, 2007). Estas células expresan Pax6, se dividen muy lentamente, y ante una lesión son capaces de formar progenitores neurales que regeneran la retina. Se ha postulado que la expresión de Pax6 es lo que permite a las células de Müller mantener la capacidad neurogénica y, de esta manera, ser capaces de generar progenitores neurales (Heins *et al.*, 2002; Götz y Barde, 2005).

Por tanto, la función de Pax6 parece estar relacionada con el mantenimiento del estado multipotente de las células progenitoras retinianas, ya sean células madre de la CNI, células de Müller o células de la ZPG.

### 5.2.2 Islet1

La inmunorreactividad para este factor de transcripción se localiza en regiones maduras de la retina, concretamente en la CNI y la CCG (Fig. 49). Mientras que en la CCG el marcaje de Islet1 es muy homogéneo, en la CNI observamos variaciones en cuanto a la morfología y la intensidad de las células marcadas. El patrón de distribución de Islet1 en la retina madura de teleosteos no se ha descrito, y únicamente se han realizado estudios durante el desarrollo del pez cebra (Shkumatava y Neumann, 2005). La función de Islet1 tampoco está clara, aunque se cree que está relacionada con la diferenciación neuronal (Pfaff *et al.*, 1996).



**Fig. 49:** Marcaje para Islet1 y su colocalización con BrdU en la retina.

En la CNI, las células positivas se distribuyen homogéneamente por toda la capa, aunque se aprecian variaciones en su morfología y en la intensidad del marcaje. En la región más vitreal encontramos células positivas a Islet1 con una morfología aplanada y una orientación paralela a la laminación de la retina. Según su localización y morfología, podemos clasificarlas como células horizontales. Nuestros datos concuerdan con lo descrito en pez cebra (Shkumatava y Neumann, 2005), aves (Sakagami *et al.*, 2003; Edqvist *et al.*,

2006; Elshatory *et al.*, 2007; Fischer *et al.*, 2007), monos y humanos (Haverkamp *et al.*, 2003).

Las células Islet1-positivas localizadas en las regiones vitreal y central de la CNI se han identificado como células amacrinas y bipolares, mientras que las células marcadas en la CCG se corresponden con células ganglionares (*pez cebra*: Shkumatava y Neumann, 2005; *aves*: Fischer *et al.*, 2002; Sakagami *et al.*, 2003; Edqvist *et al.*, 2006; *ratón*: Elshatory *et al.* 2007; *rata*: Galli-Resta *et al.*, 1997).

Las células proliferativas positivas a Islet1 se concentran en la CNI (Fig. 49). Los núcleos doblemente marcados para Islet1 y BrdU se localizan en las zonas vitreal y escleral de la capa, aunque la morfología e intensidad de marcaje es variable. Según su localización podemos considerarlos progenitores en migración.

En algunos casos hemos observado células proliferativas positivas a Islet1 en la CCG, pero únicamente se localizan en la zona adyacente a la ZT. Dichas células podrían ser células gliales, pero en ningún estudio realizado hasta la actualidad se ha demostrado la expresión de Islet1 en células de la glía. También es posible que se correspondan con células ganglionares que todavía no han finalizado el proceso de diferenciación y que mantienen su capacidad proliferativa. Otra hipótesis es que estas células se dividen inmediatamente tras el tratamiento con BrdU cuando se localizan en la ZT, y que siete días después, en el momento del sacrificio del animal, ya se han diferenciado y se encuentran en la retina madura. Por tanto corresponderían a células ganglionares diferenciadas.

En algunas secciones aparecen núcleos débilmente positivos para Islet1 en la ZT (Fig. 49). Esta expresión podría deberse a que las células en esta zona están comenzando a diferenciarse y a expresar marcadores típicos de células retinianas.

La función de Islet1 durante la retinogénesis no está bien definida. Se piensa que está implicado en la identidad y diferenciación celular (Pfaff *et al.*, 1996; Hobert y Westphal, 2000). Así se ha descrito que Islet1 está relacionado con la diferenciación de células bipolares (Elshatory *et al.*, 2007), horizontales (Liu *et al.*, 2000), amacrinas (Elshatory *et al.*, 2007) y ganglionares (Sakagami *et al.*, 2003), aunque no con los fotorreceptores. Estos datos parecen indicar que la expresión de Islet1 es necesaria en algún momento de la retinogénesis para la formación de numerosos tipos celulares retinianos.

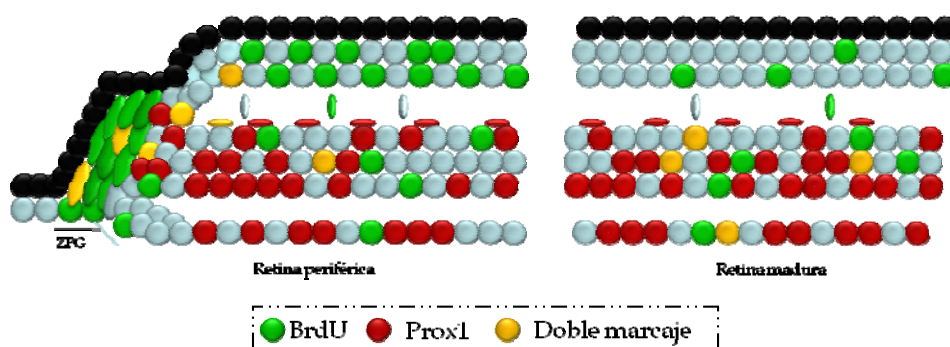
La expresión de Islet1 en los progenitores en migración de la CNI puede estar relacionada con la potencialidad que tienen estas células para generar diferentes células retinianas, es decir, la expresión de Islet1 junto con otros factores de transcripción las haría



competentes para generar otros tipos celulares diferentes de los bastones. Sin embargo, en condiciones normales el linaje de bastón solo genera bastones; por tanto, debe de haber un mecanismo para controlar que los progenitores de la CNI no se diferencien a otros tipos celulares. Se ha descrito que las expresiones de *Islet1* y *NeuroD* se solapan durante la retinogénesis (Lee *et al.*, 1995); sin embargo, la expresión de *NeuroD* está más restringida y solamente una subpoblación positiva a *Islet1* lo es también para *NeuroD* (Elshatory *et al* 2007). Estos datos coinciden con los estudios que demuestran que *NeuroD* es un marcador típico del linaje de bastón de teleosteos (Hitchcock y Kakuk-Atkins, 2004; Ochocinska y Hitchcock, 2007). Es posible que aunque la expresión de *Islet1* capacite a los progenitores en migración a generar diversos tipos celulares, la coexpresión con *NeuroD* los fuerce a diferenciarse exclusivamente a bastones. Ante una lesión, este equilibrio entre los diferentes factores de transcripción podría variar, lo que permitiría a estos progenitores generar una gran variedad de tipos celulares.

### 5.2.3 Prox1

*Prox1* se distribuye principalmente por la CNI y la CCG de la retina madura. La zona periférica también es positiva para *Prox1*, ya que observamos núcleos marcados tanto en la ZPG como en la ZT (Fig. 50). En la literatura no existen datos sobre la expresión de *Prox1* en la retina adulta de teleosteos y únicamente se han realizado estudios durante el desarrollo embrionario del pez cebra (Vihtelic *et al.*, 2001) y del pez cueva (*Astyanax Mexicanus*) (Jeffery *et al.*, 2000).



**Fig. 50:** Inmunorreactividad de *Prox1* y su colocación con BrdU en la retina.



La mayor densidad de células Prox1-positivas se localiza en la CNI (Fig. 50). Es una población muy heterogénea ya que su morfología y la intensidad del marcaje son variables. Ello indica que podría haber más de un tipo celular positivo a Prox1 en la retina madura. En la CNI se sitúan los núcleos de células de Müller, bipolares, horizontales, amacrinas y, al menos en carpín, de células interplexiformes glicinérgicas. Los núcleos positivos a Prox1 con morfología aplanada localizados en la región más escleral de la CNI, poseen todas las características para ser consideradas células horizontales. Esto coincide con lo descrito en pollo (Tomarev *et al.*, 1996; Belecky-Adams *et al.*, 1997; Edqvist y Hallböök, 2004) y en varias especies de mamíferos (Tomarev *et al.*, 1998; Dyer *et al.*, 2003) y de anfibios (Rio-Tsonis *et al.*, 1999; Makar'ev *et al.*, 2002), así como en estadios tempranos del desarrollo del pez cebra (Vihtelic *et al.*, 2001). Todo ello estaría en consonancia con el hecho de que Prox1 es necesario y suficiente para provocar la salida del ciclo celular de los progenitores retinianos y promover su diferenciación a células horizontales (Dyer *et al.*, 2003).

También hemos observado células Prox1-positivas en regiones vitreales y centrales de la CNI. Debido a que se ha demostrado que este factor de transcripción influye en la diferenciación de las células bipolares (Dyer *et al.*, 2003), podemos concluir que las células positivas a Prox1 situadas centralmente corresponden a células bipolares. Las células localizadas en la zona vítreo de la CNI se han descrito como células amacrinas AII debido a su colocalización con parvalbúmina (Dyer *et al.*, 2003). Este patrón de expresión de Prox1 en la CNI también se mantiene durante la retinogénesis en humanos (Dyer *et al.*, 2003).

Además de en la CNI, también hemos observado células positivas a Prox1 en la CCG (Fig. 50). Poseen núcleos grandes y redondeados y están intensamente marcados para Prox1. Mientras que en ratón (Dyer *et al.*, 2003) y en pollo (Boije *et al.*, 2008) no se han descrito células positivas a Prox1 en la CCG, en el pez cueva (Jeffery *et al.*, 2000) y el tritón (Markitantova *et al.*, 2004) sí se han observado. Markitantova y cols. (2004) describieron estas células como células ganglionares. Por tanto, los núcleos marcados en la CCG de la retina de carpín podrían ser células ganglionares, aunque teniendo en cuenta que las células amacrinas son positivas a Prox1, no podemos descartar que correspondan a células amacrinas desplazadas. Todo ello indica que el patrón de expresión de Prox1 en la CCG no es una característica conservada en la evolución de los vertebrados.

Se ha analizado la expresión de Prox1 en progenitores de la retina madura en tritón (Markitantova *et al.*, 2003), y se ha visto marcaje intenso en la ZPG. En nuestro trabajo hemos observado núcleos doblemente marcados para Prox1 y para BrdU tanto en la ZPG

## Discusión

---

como en la ZT. De acuerdo con lo descrito durante la retinogénesis, probablemente se correspondan con progenitores de células horizontales, amacrinas y bipolares, en división o en diferenciación (Cook, 2003; Dyer *et al.*, 2003; Edqvist y Hallböök, 2004). Además, también hemos visto células horizontales positivas a BrdU en la retina madura adyacente a la ZT, lo que podría confirmar que los progenitores de las células horizontales expresan Prox1. Otra teoría es que estas células se dividan al principio del tratamiento con BrdU y siete días después ya se han diferenciado y se localizan en la retina madura.

En la retina central también hemos visto núcleos positivos a BrdU y a Prox1 (Fig. 50). Estos progenitores se sitúan mayoritariamente en la CNI y, aunque se distribuyen por toda la capa, son más numerosos en zonas vitreales y centrales. Estas células se corresponderían con los progenitores de bastón en migración. Aunque hasta ahora no se ha demostrado que Prox1 participe en la formación de bastones durante la retinogénesis. Los retinoblastos positivos a Prox1 constituyen sólo una pequeña parte de los precursores en migración de la retina madura, lo que podría deberse a que Prox1 está presente en un período breve de su ciclo celular, tal y como parece ocurrir durante la retinogénesis (Dyer *et al.*, 2003).

En algunos casos hemos visto células progenitoras positivas a Prox1 en la zona vitreal de la CNE (Fig. 50), aunque siempre se localizan cerca de la periferia, nunca en regiones centrales de la retina. Estas células podrían pertenecer al linaje de bastón y corresponder con los precursores de bastón. Sin embargo, el hecho de que sean tan escasos y que se sitúen exclusivamente en regiones periféricas de la retina, implica que la expresión de Prox1 no es una característica compartida por todos los precursores de bastón de la retina de carpín. En la región periférica es donde se concentra la mayor densidad de precursores de bastón, ya que es en la retina de nueva formación donde se necesitan más bastones (Raymond, 1986; Johns y Fernald, 1981). Por otra parte, se ha descrito que en los progenitores retinianos Prox1 es el responsable de controlar la salida del ciclo celular evitando la diferenciación prematura (Dyer *et al.*, 2003). Por todo ello, sería esperable que los precursores de bastón continuasen expresando Prox1 en la CNE para evitar la diferenciación a bastón; de este modo podrían realizar más divisiones que proporcionarían más progenitores.

En la CCG hemos visto núcleos que colocalizan Prox1 y BrdU, sin embargo en esta capa no se han descrito progenitores neurales. En la CCG existen otras células que son capaces de proliferar y de incorporar BrdU, las células gliales. En *Drosophila* (Hidalgo y Griffiths, 2004) el gen *prospero* es el responsable de controlar el ciclo celular y de mantener quiescentes a las células precursoras gliales. Además, en el giro dentado del ratón, se han

descrito células gliales positivas a Prox1 (Lavado y Oliver, 2007). Por tanto, no podemos descartar que las células positivas a Prox1 en la CCG puedan corresponder a células gliales.

Para el mantenimiento del linaje de bastón es muy importante que las células se dividan, migren y se diferencien de modo correcto. Se ha descrito que las células progenitoras de la CNI son competentes para formar diferentes tipos celulares retinianos, mientras que los precursores de bastón ya están comprometidos a diferenciarse a bastones (Morris *et al.*, 2008). Ello implica que los progenitores de la CNI tienen que estar regulados para que en condiciones normales solo se diferencien a bastones. En este sentido, se ha demostrado que si se elimina la expresión de Prox1 las células se ven forzadas a salir del ciclo celular y se diferencian prematuramente a células horizontales (Dyer *et al.*, 2003). De esta manera, la expresión de Prox1 permite a las células continuar dividiéndose y retrasar así la diferenciación. Por ello, en condiciones normales, la función de Prox1 sería mantener la capacidad proliferativa de los progenitores en migración y evitar la diferenciación prematura a otros tipos celulares.

### 5.2.4 NeuroD

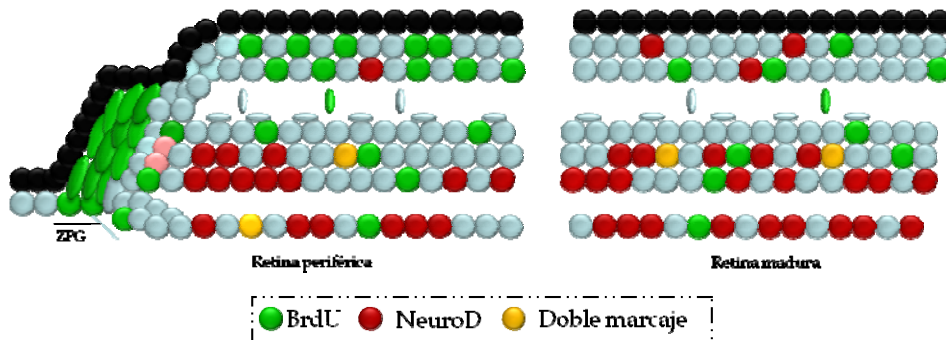
El patrón de distribución de NeuroD en la retina adulta de vertebrados es muy controvertido, ya que en función de la técnica que se utilice, hibridación *in situ* o inmunohistoquímica, los resultados varían enormemente. Por ello, en el presente trabajo hemos realizado ambas técnicas para estudiar el marcaje de NeuroD, y hemos observado pequeñas diferencias en los resultados según la técnica empleada. En la CNI y en la CCG observamos núcleos positivos a NeuroD con ambas técnicas, sin embargo, en la CNE sólo detectamos expresión de NeuroD mediante hibridación *in situ*.

La inmunorreactividad para NeuroD es muy escasa en la retina de carpín. Únicamente observamos núcleos positivos para el marcador en las regiones vitreal y central de la CNI y en la CCG (Fig. 51). En todas las especies de vertebrados estudiados se ha descrito marcaje en la CNI (*carpín*: Hitchcock y Kakuk-Atkins, 2004; *pez cebra*: Ochocinska y Hitchcock, 2007; *rata* y *ratón*: Morrow *et al.*, 1999; *mono* y *humano*: Acharya *et al.*, 1997), y en todos los casos las células positivas se han identificado como células amacrinas. Durante la retinogénesis en rata y ratón el primer máximo de expresión de NeuroD se produce durante la génesis de las células amacrinas (Morrow *et al.*, 1999).

Al estudiar la expresión de NeuroD mediante hibridación *in situ*, observamos que

## Discusión

aunque la distribución es similar a la encontrada mediante inmunohistoquímica, el número de células marcadas en la CNI es mayor. No creemos que esto se deba a que haya más tipos celulares que expresen NeuroD, sino a que la técnica de hibridación *in situ* es mucho más sensible que la inmunohistoquímica y, por ello, se pone de manifiesto una mayor cantidad de núcleos. Además, el anticuerpo contra NeuroD da un marcaje muy débil, y por ello hemos amplificado la señal utilizando estreptavidina.



**Fig. 51:** Inmunorreactividad y expresión de NeuroD y su colocalización con BrdU.

En la CNE hemos obtenido datos contradictorios, así mientras que por inmunohistoquímica no observamos núcleos positivos a NeuroD, mediante hibridación *in situ* sí. Es posible que aunque los núcleos de la CNE expresen NeuroD no pueden detectarse mediante inmunohistoquímica.

La expresión de NeuroD en la CNE es variable, en las zonas centrales de la retina el marcaje es escaso, mientras que en la región periférica hemos observado numerosos núcleos marcados. Nuestros datos concuerdan con lo descrito en carpín (Hitchcock y Kakuk-Atkins, 2004) y pez cebra (Ochocinska y Hitchcock, 2007). Se ha demostrado que NeuroD es un factor de transcripción implicado en la diferenciación de los fotorreceptores, tanto en conos como en bastones (Ochocinska y Hitchcock, 2007). Las células positivas de la CNE en la región periférica podrían ser conos en diferenciación, mientras que los núcleos NeuroD-positivos en la retina central pertenecerían al linaje de bastón (Hitchcock y Kakuk-Atkins, 2004).

La expresión de NeuroD en la CCG es más controvertida ya que mediante hibridación *in situ* no se ha detectado marcaje ni en el carpín (Hitchcock y Kakuk-Atkins, 2004) ni en el pez cebra (Ochocinska y Hitchcock, 2007). Sin embargo, utilizando hibridación *in situ* en rata y ratón (Morrow *et al.*, 1999) e inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en mono y en humano (Acharya *et al.*, 1997) sí se detectan células positivas en la CCG. En nuestro estudio

hemos visto células positivas a NeuroD en la CCG utilizando ambas técnicas (Fig. 51). En ninguno de los estudios realizados hasta la fecha se ha determinado si dichas células se corresponden a células ganglionares o a células amacrinas desplazadas, pero teniendo en cuenta que se ha descrito que NeuroD está implicado en la diferenciación de las células amacrinas (Hatakeyama y Kageyama, 2004), es más probable que se trate de células amacrinas desplazadas.

Hemos visto colocalización de BrdU y NeuroD en la región vitreal de la CNI tanto mediante inmunohistoquímica como por hibridación *in situ*. Las células marcadas podrían corresponder a los progenitores del linaje de bastón en migración. En la CNE hemos tenido muchas dificultades para distinguir las células que colocalizaban BrdU y NeuroD, ya que el marcaje de NeuroD en esta capa es muy débil y se limita a pequeños precipitados dentro del núcleo. Al realizar la técnica inmunohistoquímica contra BrdU el precipitado de DAB era más intenso que el de NBT (correspondiente al marcaje de NeuroD), lo que hacía prácticamente imposible distinguir si ese núcleo además de incorporar BrdU expresaba también NeuroD. Sin embargo, lo más probable es que las células NeuroD-positivas en la CNE correspondan a precursores de bastón, ya que, por un lado no se ha descrito expresión de NeuroD en fotorreceptores maduros, y por otro se han observado precursores de bastón positivos a NeuroD en carpín (Hitchcock y Kakuk-Atkins, 2004) y en pez cebra (Ochocinska y Hitchcock, 2007).

En ningún caso hemos observado marcaje positivo para NeuroD en la ZPG, lo que coincide con lo descrito hasta la actualidad, ya que en teleósteos NeuroD solo se ha visto en células progenitoras y nunca en células multipotentes (Hitchcock y Kakuk-Atkins, 2004). Esto contrasta con lo descrito en *Xenopus* (Ohnuma *et al.*, 2002) y en aves (Yan y Wang, 1998), donde la ZMC presenta células positivas para NeuroD. En ocasiones hemos observado núcleos débilmente marcados para NeuroD en la región más externa de la ZT, en el límite con la retina madura, en consonancia con lo descrito en pez cebra (Raymond *et al.*, 2006). Hay que resaltar que en la ZT numerosos tipos celulares están iniciando la diferenciación, entre ellos los conos y las células amacrinas, y se ha descrito que NeuroD está implicado en la diferenciación de ambos tipos celulares (Hatakeyama y Kageyama, 2004; Liu *et al.*, 2008).

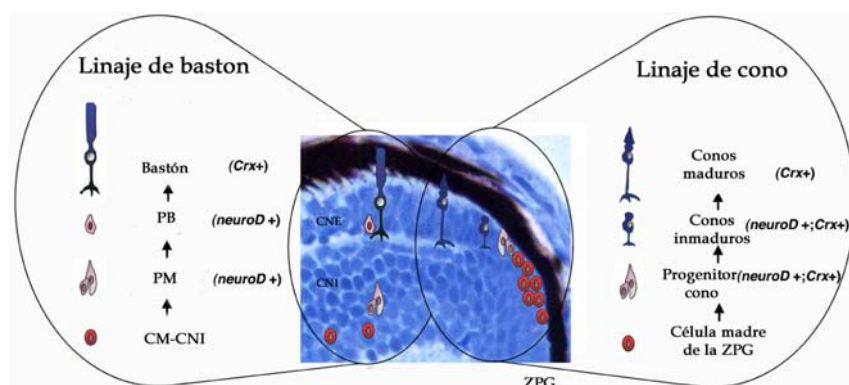
También hemos observado doble marcaje de BrdU y NeuroD en la CCG adyacente a la ZT. En ninguno de los estudios realizados en retina de vertebrados se han descrito células proliferativas en la CCG positivas a NeuroD. Este marcaje podría explicarse aceptando que

## Discusión

son células gliales localizadas en la CCG, lo que no parece probable puesto que se ha descrito que la expresión de NeuroD favorece la neurogénesis frente a la gliogénesis (Morrow *et al.*, 1999). Otra posibilidad es que estas células incorporan BrdU cuando se encuentran en la ZT y que ya han comenzado a diferenciarse en el momento del sacrificio del animal.

Entre las funciones de NeuroD se encuentran la regulación del ciclo celular, la determinación del destino neuronal y el control de la diferenciación (Lee *et al.*, 1995; Lee, 1997; Farah *et al.*, 2000). Durante la retinogénesis, NeuroD está implicado en la determinación de fotorreceptores, tanto conos como bastones, y de células amacrinas (Morrow *et al.*, 1999; Yan y Wang, 1998). NeuroD se expresa en dos linajes separados (Fig. 52): en células progenitoras localizadas en la región periférica que formarían conos, y en el linaje de bastones situado en la retina madura que generaría bastones (Ochocinska y Hitchcock, 2009). En el linaje de conos NeuroD también estaría regulando la selección de las opsinas (Liu *et al.*, 2008).

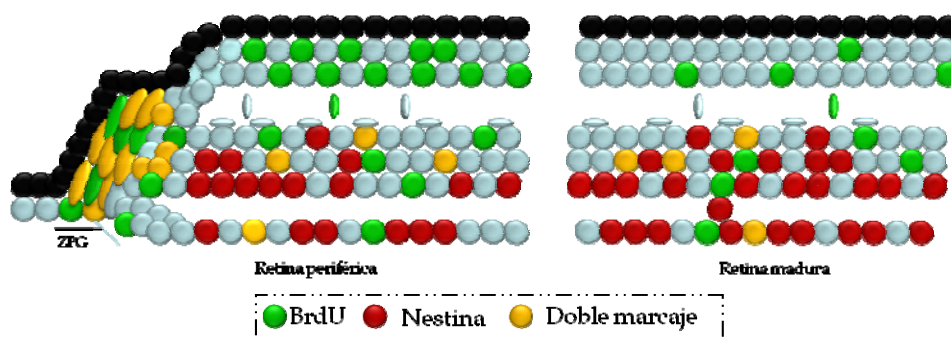
Se ha propuesto que NeuroD es necesario para que las células de los linajes de fotorreceptores salgan del ciclo celular y se diferencien, ya que en ausencia de NeuroD estas células continúan proliferando (Ochocinska y Hitchcock, 2009). Además, también se ha demostrado que este factor de transcripción inhibe la formación de las células de Müller favoreciendo la génesis de bastones (Ochocinska y Hitchcock, 2009). Por tanto, la expresión de NeuroD que observamos en los progenitores en migración estaría relacionada con la determinación celular a bastones y la inhibición de la diferenciación a células de Müller, mientras que la presencia de NeuroD en los precursores de bastón favorecería su salida del ciclo celular y su diferenciación a bastón.



**Fig. 52:** Expresión de NeuroD en el linaje de bastón y de cono. Modificado de Ochocinska y Hitchcock (2007).

### 5.2.5 Nestina

La Nestina se distribuye prácticamente por toda la retina del carpín, a excepción de la CPE y la CNE. La CNI y la CCG están intensamente marcadas para Nestina, al igual que ocurre con la zona periférica de la retina, donde observamos núcleos positivos tanto en la ZPG como en la ZT (Fig. 53). La Nestina es un marcador ampliamente utilizado para detectar células madre y progenitoras en el SNC de vertebrados. Además, se ha descrito que Nestina se expresa tanto en células neurales como en gliales en el SNC maduro (Rosser *et al.*, 1997; Blumcke *et al.*, 2001; Piper *et al.*, 2001). No hemos encontrado ninguna referencia en la literatura sobre la expresión de Nestina en la retina madura de teleósteos, habiéndose caracterizado únicamente durante la retinogénesis en el pez cebra (Mahler y Driever, 2007).



**Fig. 53:** Inmunorreactividad de Nestina y su colocalización con BrdU en la retina.

Al igual que otros marcadores analizados en este trabajo, la expresión de Nestina se localiza principalmente en las regiones vitreal y central de la CNI y en la CCG (Fig. 53). A pesar de que en el pez cebra se ha descrito una expresión transitoria en la CCG durante la retinogénesis, en estadios avanzados del desarrollo la Nestina desaparece y no se observa inmunorreactividad en la retina madura (Mahler y Driever, 2007). En modelos murinos no se ha visto expresión de Nestina en la retina (Xue *et al.*, 2006; Nickerson *et al.*, 2007). Por el contrario, en la retina humana adulta se han descrito células Nestina-positivas en la CNI y en la CCG (Mayer *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2007). En la retina humana las células positivas a Nestina de la CCG han sido descritas como células ganglionares (Mayer *et al.*, 2003), pero no existen referencias sobre la posible identidad de las células de la CNI. La distribución y el número de células positivas a Nestina en la CNI que nosotros observamos, indican que debe haber más de un tipo celular marcado. Un posible candidato son las células de Müller, tomando en consideración que durante la retinogénesis de rata se observa marcaje transitorio

para este marcador en las mismas (Xue *et al.*, 2006).

En ocasiones también hemos visto células Nestina-positivas en la CPI (Fig. 53). Dado que se han encontrado células ganglionares positivas a Nestina (Mayer *et al.*, 2003), podrían corresponder a células ganglionares desplazadas, aunque también podrían ser células gliales o células amacrinas desplazadas.

En la retina de carpín el MC es inmunopositivo para Nestina. Hasta ahora en teleósteos no se había descrito expresión de Nestina en esta zona, pero sí en la retina adulta de mamíferos donde la mayor fuente de células positivas a Nestina se encuentra en el cuerpo ciliar (*ratón*: Tropepe *et al.*, 2000; Nickerson *et al.*, 2007; *rata*: Ahmad *et al.*, 2000; *humano*: Hu *et al.*, 2007), que es el equivalente anatómico en mamíferos al MC en teleósteos.

Las células positivas a Nestina y que han incorporado BrdU se localizan en casi todas las capas de la retina. En la CNI las células progenitoras se distribuyen por todo el espesor de la capa, y se corresponden con los progenitores en migración pertenecientes al linaje de bastón. Es la primera vez que se demuestra la presencia de Nestina en las células del linaje de bastón. Se ha descrito que en ratón (Yamaguchi *et al.*, 2000) y en pez cebra (Mahler y Driever, 2007) la expresión de Nestina en estadios adultos se restringe a las zonas proliferativas del SNC, lo que apoyaría nuestros resultados, ya que el linaje de bastón es uno de los dos focos de proliferación que describimos en la retina adulta del carpín.

En todas las secciones analizadas hemos observado marcaje para Nestina en la CNE más adyacente a la ZT. Según su localización estas células corresponderían a progenitores de conos. Teniendo en cuenta que prácticamente todas las células madre y progenitoras de la retina de carpín son Nestina-positivas, parece probable encontrar expresión en el linaje de conos.

En la retina madura hemos localizado células proliferativas en la CCG. No podemos descartar que se traten de células gliales, dado que se han descrito astrocitos positivos a Nestina en la CCG de rata (Wan *et al.*, 2008).

La región periférica de la retina presenta altos niveles de inmunorreactividad para Nestina. Hemos visto células progenitoras tanto en la ZPG como en la ZT, datos que concuerdan con lo descrito durante el desarrollo del pez cebra (Mahler y Driever, 2007). Por tanto, Nestina no sólo se expresaría en la mayor parte de los progenitores retinianos, sino también en las células madre de la ZPG.

La Nestina se expresa en la gran mayoría de células madre y progenitoras del SNC, aunque su expresión disminuye cuando la célula comienza a diferenciarse (Lendahl *et al.*,



1990). Sin embargo, se ha descrito que algunas células maduras son capaces de mantener la expresión de Nestina (Rosser *et al.*, 1997; Blumcke *et al.*, 2001; Piper *et al.*, 2001; Mayer *et al.*, 2003).

Hemos observado Nestina tanto en células madre como en progenitores, lo que implica que la expresión de esta proteína debe ser muy importante independientemente del grado de madurez de la célula. La función de Nestina en las células progenitoras no está clara, se ha postulado que está implicada en la organización intracelular del citoesqueleto en procesos como la mitosis, la migración y la diferenciación celular (Goldman *et al.*, 1999). Hemos visto expresión de Nestina en las células del linaje de bastón localizadas en la CNI; pero en la CNE, donde la tasa de proliferación de los progenitores es más alta, no hemos encontrado marcaje para ella. Esto demostraría que los precursores de bastón no necesitarían Nestina para dividirse, por lo que su función podría estar más relacionada con el proceso de migración o con el mantenimiento de un grado de inmadurez en las células progenitoras, lo que explicaría la expresión de este marcador en la ZPG.

### 5.2.6 CD133

CD133 se localiza exclusivamente en las regiones central y escleral de la CNI y en la CCG. La prominina1 es una proteína que se localiza tanto en células maduras, como en células progenitoras. En este trabajo hemos utilizado un anticuerpo, CD133, que reconoce un epítipo de la prominina1, AC133, que es característico de células progenitoras. En la literatura no hemos encontrado ningún estudio sobre la expresión de CD133 en la retina de teleósteos y solo hay un trabajo que describe el marcaje de CD133 en la retina de ratón (Maw *et al.*, 2000), y algunos datos aislados en anfibios y pollo (Jászai *et al.*, 2007).

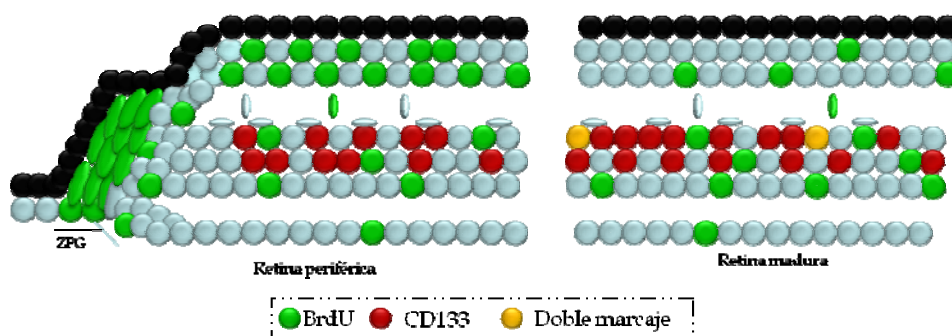


Fig. 54: Inmunorreactividad para CD133 y su colocalización con BrdU en la retina.

El marcaje de esta proteína se localiza principalmente en la región externa de la célula, posiblemente en la membrana plasmática, ya que se considera que es una proteína transmembrana. La expresión de CD133 está limitada a la región vitreal de la CNI y a los fotorreceptores (Fig. 54). Maw y cols. (2000) describieron que las únicas células maduras positivas a CD133 en la retina de ratón son los bastones, y que no hay expresión de este marcador en el resto de las capas. En retina humana, las células CD133-positivas se han aislado y caracterizado *in vitro* (Carter *et al.*, 2009). Tras estudiar la colocalización de la proteína con diversos marcadores retinianos, se ha observado que las células CD133-positivas expresaban niveles bajos de marcadores de células de Müller y de células gliales. Por tanto, es posible que algunas de las células marcadas en la CNI se correspondan con células de Müller.

En la retina de carpín hemos observado fotorreceptores intensamente marcados para CD133, pudiendo tratarse tanto de bastones como de conos. La expresión de este marcador en bastones maduros se ha descrito en todas las especies analizadas (*rana*: Jászai *et al.*, 2007; *ratón*: Maw *et al.*, 2000; *humano*: Zhang *et al.*, 2007; Carter *et al.*, 2009); sin embargo, sólo en un estudio realizado en humanos se observa marcaje en los conos (Jászai *et al.*, 2007). Además, la distribución del marcaje en conos y bastones parece ser diferente, ya que en bastones, CD133 se localiza principalmente en la base del segmento externo, donde se produce la biogénesis de los discos membranosos, mientras que en los conos se localiza por todo el segmento externo (Jászai *et al.*, 2007). Sin embargo, en nuestro estudio no hemos observado variabilidad en el marcaje de los fotorreceptores, ya que CD133 se distribuye por toda la célula.

Nuestros resultados parecen indicar que CD133 se expresa tanto en conos como en bastones maduros, ya que, en la retina madura adyacente a la ZT hemos observado fotorreceptores positivos a CD133, lo que indicaría que se trata de conos, dado que en esa región todavía no se han diferenciado bastones.

Las únicas células proliferativas positivas a CD133 se localizan en la región escleral de la CNI. Estas células podrían ser progenitores en migración pertenecientes al linaje de bastón. Nuestros datos concuerdan con lo descrito durante la retinogénesis en anfibios, pollo (Jászai *et al.*, 2007) y ratón (Maw *et al.*, 2000), donde se han observado progenitores de bastón positivos a CD133.

En nuestros resultados la zona periférica de la retina es negativa para CD133, ya que no encontramos células positivas ni en la ZPG ni en la ZT. Ello indicaría que CD133 se expresa

exclusivamente en células progenitoras y no en células madre de la retina. En ningún caso hemos observado células proliferativas en otras capas de la retina.

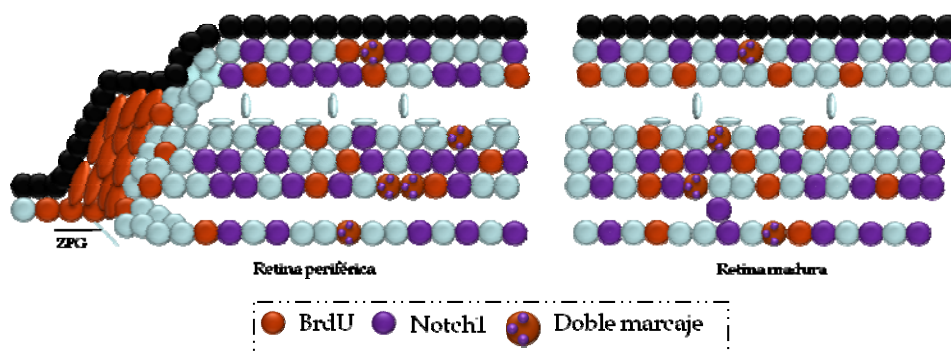
CD133 es imprescindible para la supervivencia de los fotorreceptores, ya que mutaciones en el gen de la *promininal* provocan la muerte de los bastones. En humanos, estas mutaciones provocan diferentes patologías retinianas como la degeneración macular (Yang *et al.*, 2008) y la retinosis pigmentaria (Zhang *et al.*, 2007).

La función de CD133 es todavía desconocida, ya que no se conocen ni sus ligandos ni sus posibles interacciones con moléculas intracelulares. Se ha descrito que en las células maduras es responsable de la estabilización de la membrana gracias a su asociación con el colesterol (Corbeil *et al.*, 1999), como por ejemplo en los fotorreceptores donde participaría en la biogénesis de los discos membranosos (Corbeil *et al.*, 1999).

En células progenitoras, CD133 podría participar en la migración y la interacción de las células progenitoras con otras células o con la matriz celular (Shmelkov *et al.*, 2005), lo que concuerda con nuestros datos, ya que las únicas células del linaje de bastón que expresan CD133 son los progenitores en migración.

### 5.2.7. Notch1

Notch1 está ampliamente distribuido por toda la retina madura, ya que observamos marcaje en todas las capas, a excepción de la CPE. En la literatura no existen datos sobre el patrón de distribución de Notch1 en la retina madura de teleósteos, únicamente hay un estudio sobre la retinogénesis en el pez cebra (Raymond *et al.*, 1996) y sólo hace referencia a la ZPG y a las células del linaje de bastón. Los datos sobre el marcaje de Notch1 en la retina adulta son contradictorios, ya que varían en función de la técnica utilizada.



**Fig. 55:** Expresión de Notch1 e incorporación de BrdU en la retina.

Hemos observado expresión de Notch1 en todas las capas nucleares de la retina (Fig. 55). En la CNI los núcleos positivos a Notch1 se localizan por todo el espesor de la capa, aunque se concentran en las regiones vitreal y central de la misma. Aunque durante la retinogénesis de todas las especies estudiadas se ha descrito marcaje en la CNI (*rana*: Dorsky *et al.*, 1995; *pollo*: Hayes *et al.*, 2007; *rata*: Bao y Cepko, 1997), únicamente un estudio en rata (Ahmad *et al.*, 1995) y otro en ratón (Fukurawa *et al.*, 2000) describen marcaje en la retina adulta, en el resto de estudios no se describe expresión de Notch1 en células diferenciadas de la retina madura. El único tipo celular positivo a Notch1 que se ha identificado en la CNI de la retina adulta son las células de Müller (Dorsky *et al.*, 1995; Fukurawa *et al.*, 2000). Debido al gran número de núcleos positivos a Notch1 y a su variedad en cuanto al tamaño y la intensidad de marcaje, podemos afirmar que en la CNI de la retina madura de carpín existe más de un tipo celular positivo a este marcador. Notch1 está implicado en la diferenciación de numerosos tipos celulares retinianos, por lo que es muy difícil precisar en qué células se puede estar expresando en la retina madura. A pesar de ello, la morfología de algunos núcleos y su localización en la región vitreal de la CNI podría indicar que se corresponden con células amacrinas, si bien sería necesario realizar dobles marcajes con marcadores típicos de células amacrinas para confirmarlo.

El patrón de expresión de Notch1 en la CNE es variable: en zonas maduras de la retina el marcaje es escaso, mientras que en la periferia casi todos los núcleos son positivos. Esta variabilidad y el hecho de que en ningún estudio se hayan descrito células diferenciadas marcadas en la CNE, nos lleva a pensar que este marcaje pertenece a células proliferativas y no a fotorreceptores maduros.

En la CCG encontramos numerosos núcleos positivos a Notch1. Estos núcleos poseen dos morfologías diferentes, unos son grandes e intensamente marcados y otros son más pequeños y con un marcaje más débil. Ello parece indicar que al menos existen dos tipos celulares positivos a Notch1 en la CCG. Los estudios realizados durante la retinogénesis (*rana*: Dorsky *et al.*, 1995; *pollo*: Hayes *et al.*, 2007; *rata*: Bao y Cepko, 1997), y en etapas adultas (Ahmad *et al.*, 1995) describen que las células ganglionares son positivas para Notch1. Ello indicaría que, al menos las células ganglionares son Notch1-positivas; sin embargo, no tenemos ningún dato sobre la identidad del otro tipo celular. Debemos considerar la posibilidad de que se trate de células amacrinas desplazadas o que correspondan a células gliales, ya que se ha descrito que Notch1 favorece la gliogénesis frente a la neurogénesis (Bao y Cepko, 1997).

En algunas secciones hemos observado núcleos positivos a Notch1 en la CPI. Podría tratarse tanto de células amacrinas desplazadas como de células ganglionares desplazadas. Dado a que únicamente tenemos constancia de la expresión de Notch1 por parte de las células ganglionares, es más lógico pensar que las células en la CPI se corresponden con células ganglionares desplazadas.

Hemos visto también expresión de Notch1 en el MC. En pez cebra Raymond y cols. (2006) han observado marcaje de Notch1 en el límite de la ZPG y el MC, aunque su nivel de expresión es muy bajo. En ningún estudio realizado en mamíferos se ha descrito marcaje para Notch1 en el cuerpo ciliar.

Estudios realizados en rana (Perron *et al.*, 1998) y pollo (Fischer y Reh, 2000) demuestran que Notch1 se expresa en la ZMC, el equivalente a la ZPG en teleósteos. Además, en la retinogénesis del pez cebra (Raymond *et al.*, 2006) se ha descrito que las células de la ZPG expresan Notch1, aunque en niveles muy bajos. Sin embargo, en nuestro estudio no hemos encontrado expresión de Notch1 en esta zona. Hay dos posibles explicaciones para nuestros resultados: que la ZPG de carpín exprese Notch1 aunque en niveles demasiado bajos como para ser detectados, o que la expresión de Notch1 sólo se produzca durante la retinogénesis y en la retina madura la ZPG sea negativa para este marcador.

Hemos identificado células proliferativas positivas a Notch1 en todas las capas nucleares de la retina (Fig. 55). En la CNI las células que además de expresar Notch1 han incorporado BrdU se localizan en toda la capa. Estos progenitores se corresponderían con los progenitores en migración pertenecientes al linaje de bastón, coincidiendo con lo descrito en el pez cebra (Raymond *et al.*, 2006). También hemos visto núcleos doblemente marcados en la región más vitreal de la CNI. Esto podría deberse a un efecto del corte o podría tratarse de células madre de la CNI positivas a Notch1. El único marcador que existe para identificar estas células es Pax6, pero teniendo en cuenta que una de las funciones de Notch1 es mantener la capacidad proliferativa de las células progenitoras e inhibir la diferenciación neuronal, sería lógico que las células madre de la CNI expresasen Notch1.

Raymond y cols. (2006) han descrito que no sólo los progenitores en migración son positivos a Notch1, sino también los precursores de bastón, lo que concuerda con nuestros resultados en la CNE (Fig. 55). La variabilidad en el marcaje puede deberse a que en zonas centrales de la retina el número de precursores de bastón es menor y por ello el marcaje para Notch1 está más limitado, mientras que la proliferación en la zona periférica de la retina es

mucho mayor, lo que provocaría un aumento de la expresión de Notch1. De esta manera los precursores de bastón se mantendrían más tiempo indiferenciados y tardarían mucho más en abandonar el ciclo celular para diferenciarse a bastón. Teniendo en cuenta que se han descrito varios marcadores comunes en los linajes de conos y bastones, es posible que en las zonas periféricas, además de estar marcando los precursores de bastón, Notch1 se exprese en los progenitores de conos, explicando así la mayor densidad de marcaje en esta zona.

Por último, también hemos encontrado células proliferativas positivas a Notch1 en la CCG y en el NO. En ningún caso se han descrito células progenitoras en estas regiones de la retina adulta de carpín, por lo que pensamos que estas células podrían corresponder a células gliales.

Diferentes estudios en vertebrados e invertebrados han demostrado que la función de Notch1 no es uniforme, y que varía en función del tipo celular en el que se exprese y el grado de maduración del mismo (Perron y Harris, 2000). Una de las funciones de Notch1 y su ligando Delta durante la retinogénesis de vertebrados es mantener a los progenitores inmaduros (Chitnis *et al.*, 1995; Henrique *et al.*, 1995; Henrique *et al.*, 1997; Perron y Harris, 2000) e impedir su diferenciación prematura. Además de esta función general durante el desarrollo, se ha descrito que Notch1 puede inhibir específicamente la diferenciación de tipos celulares concretos (Silva *et al.*, 2003).

En la literatura existen datos contradictorios sobre la actuación de Notch1 en la activación de la gliogénesis *versus* la neurogénesis. En la retina se ha descrito que Notch1 favorece la formación de células de Müller frente a otros tipos celulares (Dorsky *et al.*, 1995; Hojo *et al.*, 2000; Furukawa *et al.*, 2000; Chambers *et al.*, 2001; Scheer *et al.*, 2001; Gaiano y Fishell, 2002); sin embargo, en el NO (Wang *et al.*, 1998) y la médula espinal (Genoud *et al.*, 2002) Notch1 inhibe la gliogénesis. Por otro lado, se ha descrito que la activación constitutiva de Notch1 es capaz de mantener las características de las células progenitoras sin modificar su identidad celular (Jadhav *et al.*, 2006a). Todos estos datos demuestran que Notch1 es capaz de realizar funciones totalmente diferentes dependiendo del contexto celular y el momento del desarrollo. Esta variabilidad en su función podría deberse a la existencia de al menos 4 tipos de ligandos Delta en teleósteos (Raymond *et al.*, 2006), DeltaA, DeltaB, DeltaC y DeltaD, y que a su vez Notch1 puede activar diferentes genes *Hes* que inhiben diferentes genes *bHLH*. Todo ello provocaría que las respuestas ante la activación o inhibición de Notch1 sean tan dispares.

En un ratón mutante para uno de los efectores de Notch1, *Hes*, se observó la prematura

diferenciación a bastones (Tomita *et al.*, 1996); sin embargo, la inactivación directa de Notch1 provoca la diferenciación de conos (Yaron *et al.*, 2006). En otros estudios se ha descrito que la eliminación de Notch1 en progenitores tempranos promovía la diferenciación a conos; sin embargo, si hacían lo mismo en etapas más tardías del desarrollo se diferenciaban a bastones (Jadhav *et al.*, 2006b). Debido a esta variabilidad, no se ha podido precisar la función exacta que puede estar realizando Notch1 en el linaje de bastón.

En el presente trabajo hemos observado marcaje de Notch1 en todas las células pertenecientes al linaje de bastón, lo que demuestra la importancia que tiene este factor de transcripción en la génesis y diferenciación de los bastones en la retina adulta. Sin embargo, la expresión de Notch1 no es homogénea, ya que en la CNE encontramos la mayor densidad de células progenitoras pero es la capa con menor marcaje para Notch1. Es posible que Notch1 esté realizando funciones diferentes según la capa de la retina y el tipo de progenitor de bastón. En la CNI parece que la función de Notch1 es la de mantener el estado inmaduro de las células progenitoras y también la de inhibir la diferenciación prematura a bastón. Esto permitiría que las células progenitoras de la CNI no sólo mantengan su capacidad proliferativa sino también la potencialidad para generar otros tipos celulares. Cuando los progenitores en migración llegan a la CNE los cambios en el microambiente podrían provocar la inhibición de Notch1 y permitir así la diferenciación a bastón. Además, es muy probable que Notch1 esté realizando una función muy parecida en el linaje de conos, ya que se ha demostrado que la inactivación de Notch1 puede provocar la diferenciación prematura tanto de conos como de bastones, dependiendo del contexto celular (Tomita *et al.*, 1996; Yaron *et al.*, 2006).

### 5.3 Implicación funcional de los marcadores estudiados en la regulación de la neurogénesis

La expresión de los marcadores utilizados para caracterizar los progenitores retinianos es muy diversa (Fig. 56). Mientras que algunos sólo se expresan en células progenitoras, otros marcan también células madre.

En la ZPG únicamente hemos observado expresión de Pax6, Prox1 y Nestina, proteínas que están implicadas en el mantenimiento de la multipotencialidad de los retinoblastos y en la regulación del ciclo celular (Goldman *et al.*, 1999; Weissman, 2000; Dyer *et al.*, 2003).

En la ZT encontramos expresión de numerosos marcadores como Pax6, Prox1, Nestina, Islet1 y NeuroD. La alta inmunorreactividad en esta zona se debe a que los retinoblastos están adquiriendo la identidad celular y comienzan a diferenciarse. Todos estos marcadores están involucrados de alguna manera en la determinación y diferenciación celular de uno o más tipos celulares retinianos.

En el linaje de bastón el patrón de expresión de los marcadores varía en función de su localización en la retina y del grado de madurez del progenitor. A medida que los progenitores migran hacia zonas más esclerales se van diferenciando progresivamente. Las células madre de la CNI únicamente expresan Notch1 y Pax6, lo que es lógico ya que la función de ambos factores de transcripción es mantener a los progenitores inmaduros y conservar así la población de retinoblastos retinianos.

La mayor diversidad la encontramos en los progenitores en migración, ya que son positivos a todos los marcadores estudiados a excepción de Pax6. Sin embargo, sólo NeuroD y Notch1 parecen estar implicados directamente en la determinación y diferenciación de los bastones, por lo que el resto de marcadores deben estar realizando otras funciones en los progenitores en migración. Nestina y CD133 podrían estar involucrados en el proceso de migración de las células progenitoras, ya que Nestina es un componente del citoesqueleto, y CD133 se asocia al colesterol y mantiene la estabilidad de las protuberancias de membrana.

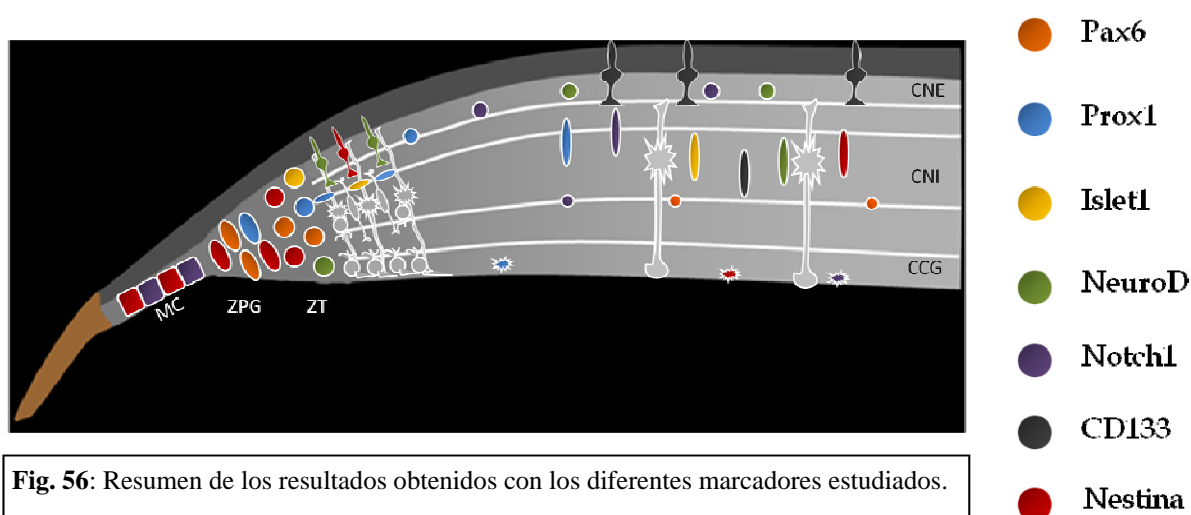
Se ha descrito que los progenitores localizados en la CNI no sólo generan bastones, sino que ante una lesión son capaces de diferenciarse a cualquier tipo celular retiniano. Esto implica que las células progenitoras en migración deben de mantener la pluripotencialidad celular, pero a su vez tienen que estar reguladas para que en condiciones normales



únicamente se diferencien a bastones. *Islet1* se ha relacionado con la diferenciación de numerosos tipos celulares como células bipolares (Elshatory *et al.*, 2007), horizontales (Liu *et al.*, 2000), amacrinas (Elshatory *et al.*, 2007) y ganglionares (Sakagami *et al.*, 2003), por tanto es posible que este factor de transcripción esté ayudando a mantener la capacidad pluripotente de los progenitores en migración. *Prox1*, a su vez, es un factor de transcripción capaz de mantener la capacidad proliferativa de los progenitores en migración y evitar la diferenciación prematura a otros tipos celulares.

Por tanto, la expresión de los marcadores estudiados en los progenitores en migración tendría diferentes implicaciones funcionales. *Notch1* y *NeuroD* regularían la determinación y diferenciación hacia bastones, *Nestina* y *CD133* estarían implicados en el proceso de migración celular, *Islet1* mantendría la capacidad de los progenitores para generar cualquier tipo retiniano, y por último *Prox1* evitaría, que, en condiciones normales, los progenitores se diferenciase a otro tipo celular que no fuesen bastones.

Cuando los progenitores en migración llegan a la CNE se comprometen exclusivamente a bastones y pasan a ser precursores de bastón. Debido a que ya solo son capaces de generar bastones, dejan de expresar factores de transcripción típicos de otros tipos celulares como *Prox1* o *Islet1*. En los precursores de bastón de la CNE únicamente hemos observado expresión de *NeuroD* y de *Notch1*. Ambos marcadores están implicados en la determinación celular y la diferenciación de los progenitores de bastón.



Sin embargo, la regulación de este proceso no debe ser tan simple, y seguramente es la combinación de dos o más factores lo que determina la identidad celular y la tasa de proliferación. Durante el proceso de migración los progenitores van atravesando diferentes

capas de la retina, lo que implica que las células con las que interactúan y las moléculas a las que están expuestos cambian. Estas variaciones en el microambiente generan cambios en la expresión de los marcadores, que a su vez modifican la pluripotencialidad y la tasa de proliferación de las células progenitoras.

En el presente trabajo hemos descrito la expresión de diferentes factores de transcripción y proteínas que están involucrados con la génesis, migración o diferenciación de bastones en la retina adulta del carpín. Además, hemos propuesto un modelo sobre el comportamiento de las células progenitoras en la retina madura. Aunque todavía faltan muchas respuestas para comprender la regulación completa de este proceso, las técnicas diseñadas en el presente Trabajo Doctoral permiten aportar nuevos datos para esclarecer la regulación del linaje de bastones.

## 5.4 Caracterización *in vitro* de progenitores neurales

La degeneración de los fotorreceptores es una de las principales causas de ceguera en humanos, por ello se han realizado numerosos estudios para intentar reponer las células que ya se han perdido. La terapia más utilizada es el trasplante, ya sea de explantes retinianos (Tabla 11) o de progenitores aislados (Tabla 12). Sin embargo, los resultados no han sido demasiado prometedores, ya que las células no se integran en la retina en degeneración y en el mejor de los casos sólo retrasan la degeneración. Los mejores resultados fueron obtenidos por MacLaren y cols. (2006) al trasplantar progenitores de bastón en una retina en degeneración. Estas células eran capaces de migrar hasta la CNE, de integrarse y de diferenciarse a bastones maduros, mejorando así la función visual. Además, este estudio demostró que para que un trasplante de progenitores retinianos tenga éxito hay que tener en cuenta el grado de diferenciación de las células, ya que células muy inmaduras o muy diferenciadas son incapaces de integrarse en la retina en degeneración y reponer los fotorreceptores dañados. Esto implica que es necesario conocer con gran precisión el proceso de diferenciación y la potencialidad de las células a trasplantar.

En mamíferos los progenitores de bastón se generan en la retina embrionaria durante

un periodo muy corto de tiempo, lo que dificulta enormemente su obtención y procesamiento, y por tanto su caracterización. Por ello, es necesario utilizar de nuevos modelos animales que faciliten la caracterización tanto *in vivo* como *in vitro* de los progenitores de bastón para su posible uso en terapia celular. La retina de teleósteos es un modelo ideal para caracterizar estas células, ya que en una retina control podemos estudiar tanto el proceso de proliferación y migración, como el de diferenciación. Sin embargo, aunque la caracterización *in vivo* no presenta grandes inconvenientes, el estudio *in vitro* es muy complicado por la ausencia de datos en la literatura y por la falta de productos específicos para el cultivo de células de pez.

Especie	Lesión	Adulto/embrionario	Tipo de tejido	Recuperación	Referencia
Rata	Fotolesión	Adulto	Capa de fotorreceptores	Se integra en la retina	(Silverman y Hughes, 1989)
	Retinosis pigmentaria	Embrionario	Explantado de retina	Recuperación visual solo donde se integra el tejido	(Sagdullaev <i>et al.</i> , 2003)
Ratón	Retinosis pigmentaria	Embrionario	Explantado de retina	Baja recuperación visual	(Arai <i>et al.</i> , 2004)
Humano	Retinosis pigmentaria	Embrionario	Explantado de retina	El trasplante sobrevive hasta 1 año. Mejora continuada.	(Radtko <i>et al.</i> , 2004)

**Tabla 11:** Resumen de los trasplantes de explantes realizados en mamíferos y su grado de recuperación.

Especie	Lesión	Adulto/embrionario	Tipo de tejido	Recuperación	Referencia
Ratón	Retinosis pigmentaria	Embrionario	Células progenitoras retinianas	Se integran mayoritariamente en la GCL	(Canola <i>et al.</i> , 2007)
	Varios tipos de degeneraciones retinianas	Embrionario	Progenitores de bastón	Formación de nuevos bastones. Recuperación de la función visual	(MacLaren <i>et al.</i> , 2006)
Rata	Retinas distrofas	Adulto	Células progenitoras de hipocampo	Las células no se integran en la retina	(Young <i>et al.</i> , 2000)
Rata	RCS	Embrionario	Células madre	Retrasan la degeneración	(Schraermeyer <i>et al.</i> , 2001)
Rata	Retina control	Embrionario/Adulto	Células progenitoras retinianas	Las células no se integran en la retina	(Chacko <i>et al.</i> , 2003)
Rata	Degeneración de fotorreceptores	Embrionario	Células progenitoras retinianas	Las células no se integran en la retina.	(Qiu <i>et al.</i> , 2004)
Cerdo	Retina control	Embrionario	Células progenitoras retinianas	Baja tasa de integración en la retina	(Klassen <i>et al.</i> , 2007)
<u>Donador:</u> humano <u>Receptor:</u> ratón y pollo	Retina control	Adulto	Células progenitoras retinianas	<u>Ratón:</u> las células se diferencian a bastones <u>Pollo:</u> las células se diferencian a células de estirpe neuronal	(Coles <i>et al.</i> , 2004)
<u>Donador:</u> humano <u>Receptor:</u> Rata	Retina control	Embrionario	Célula madre	Se integran en la retina y expresan marcadores de fotorreceptores	(Banin <i>et al.</i> , 2006)

**Tabla 12:** Trasplante de retinoblastos en mamíferos y su grado de recuperación.

Los progenitores retinianos de mamíferos han sido caracterizados tanto *in vivo* como *in vitro*. Estas células poseen una potencialidad restringida (Fischer y Reh, 2000) y aunque no sean capaces de regenerar ante una lesión, *in vitro* se comportan como células madre (Ahmad *et al.*, 2000; Tropepe *et al.*, 2000; Kubota *et al.*, 2002). Ello ha provocado que la aproximación más utilizada para caracterizar estas células haya sido el cultivo celular (Tabla 12). Se han realizado cultivos primarios de progenitores retinianos de ratón (Giordano *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007a,b), de rata (Ahmad *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2002b; Engelhardt *et al.*, 2004; Qiu *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007a), de cerdo (MacNeil *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2007) y humanos (Yang *et al.*, 2002a; Aleksyandrova *et al.*, 2006; Gamm *et al.*, 2005; Vossmerbaeumer *et al.*, 2008; Xu *et al.* 2007a; Carter *et al.*, 2009).

A pesar de que los peces teleósteos constituyen un modelo de experimentación cada vez más utilizado, al demostrarse que son capaces de regenerar la retina ante una lesión, apenas hay estudios *in vitro* sobre los progenitores retinianos. Solo se han realizado cultivos primarios de progenitores neurales del encéfalo en el pez cuchillo (Hinsch y Zupanc, 2006), por lo que hay muy pocos datos sobre las condiciones de cultivo necesarias para crecer retinoblastos de retina madura. Para la puesta a punto de nuestro protocolo, hemos analizado las condiciones y medios de cultivo que se han utilizado en retinoblastos de mamíferos y comprobamos aquellos que podrían funcionar en teleósteos.

El primer problema que nos planteamos fue la temperatura a la que realizar los cultivos celulares ya que estos peces tienen una temperatura corporal de 20°C. En la literatura no hemos encontrado que se hayan realizado cultivos celulares a 20°C, la temperatura más baja utilizada es de 25°C (Hinsch y Zupanc, 2006). Esto nos planteaba un problema porque ninguno de los medios de cultivo o suplementos han sido probados a estas temperaturas. Por ello, inicialmente comprobamos si los medios de cultivo mantenían un pH estable a esa temperatura o era necesario añadirle otros productos que ayudasen a tamponar la solución. Tras realizar diferentes pruebas comprobamos que todos los medios de cultivo utilizados en el presente trabajo se mantenían estables a 20°C y con 5% de CO<sub>2</sub>.

El siguiente paso fue seleccionar la disgregación más efectiva para obtener células aisladas de retina madura. Descartamos los protocolos utilizados en cerdo y en humano, ya que la retina de estos mamíferos contiene la membrana de Bruch, lo que obliga a utilizar tratamientos enzimáticos específicos que no son necesarios en nuestro caso. Tras repasar los protocolos de digestión enzimática utilizados en cultivos primarios de rata y ratón,

utilizamos el descrito por Engelhardt y cols. (2004), ya que no es un tratamiento muy agresivo y por ello conseguimos una alta viabilidad celular.

Especie	Origen	Medio de cultivo	Suplementos	Tª	Duración cultivo	Referencia
Ratón	Cuerpo ciliar adulto	DMEM/F12	FGF/EGF/N <sub>2</sub>	37°C	7 días	(Giordano <i>et al.</i> , 2007)
	Cuerpo ciliar adulto y embrionario	Medio sin suero	FGF/Heparina	37°C	7 días	(Xu <i>et al.</i> , 2007a)
	Cuerpo ciliar adulto	Medio sin suero	FGF/EGF/Heparina	37°C	7-10 días	(Xu <i>et al.</i> , 2007a)
Rata	Retina embrionaria	DMEM/F12	EGF/N <sub>2</sub>	37°C	7 días	(Ahmad <i>et al.</i> , 1999)
	Retina embrionaria	DMEM/F12	FGF/N <sub>2</sub>	37°C	7 días	(Yang <i>et al.</i> , 2002b)
	Retina adulta	Neurobasal A	FGF/EGF/B27	37°C	1 mes	(Engelhardt <i>et al.</i> , 2004)
	Retina embrionaria	Medio sin suero		37°C	Pase 10	(Qiu <i>et al.</i> , 2004)
	Retina embrionaria	DMEM/F12	FGF/EGF/N <sub>2</sub> /LIF	37°C	4 días	(Yang <i>et al.</i> , 2006)
	Retina embrionaria	DMEM/F12	FGF/EGF/B27/N <sub>2</sub>	37°C	Pase 4	(Yao <i>et al.</i> , 2006)
	Retina embrionaria	Medio sin suero	FGF/EGF	37°C	Pase 6	(Qiu <i>et al.</i> , 2007)
	Cuerpo ciliar adulto	Medio sin suero	FGF/EGF/Heparina	37°C	7-10 días	(Xu <i>et al.</i> , 2007a)
Cerdo	Retina embrionaria	DMEM/F12	FGF/EGF	37°C	3 semanas	(Klassen <i>et al.</i> , 2007)
	Iris, Pars plana y cuerpo ciliar adulto	DMEM/F12	FGF/EGF/N <sub>2</sub> /Heparina	37°C	2 semanas	(MacNeil <i>et al.</i> , 2007)
	Retina embrionaria	Medio sin suero	FGF/EGF	37°C	7 días	(Gu <i>et al.</i> , 2007)
Humano	Retina embrionaria	DMEM/F12	FGF/N <sub>2</sub>	37°C	8 días	(Yang <i>et al.</i> , 2002a)
	Cuerpo ciliar adulto	Medio sin suero	FGF/EGF/Heparina	37°C	7-10 días	(Xu <i>et al.</i> , 2007a)
	Limbo adulto	DMEM/F12	FGF/EGF	37°C	9 meses	(Vossmerbaeumer <i>et al.</i> , 2008)
	Retina adulta	DMEM/F12	FGF/N <sub>2</sub> /LIF	37°C	3 semanas	(Carter <i>et al.</i> , 2009)

**Tabla 13:** Cultivos primarios de progenitores retinianos en mamíferos

Mayor complejidad presentó la elección de los medios de cultivo y de los suplementos a utilizar en nuestros cultivos. Como puede comprobarse en la Tabla 13, la mayoría de los estudios realizados utilizan DMEM/F12 como medio de cultivo suplementado con EGF y FGF. Por ello, las primeras pruebas se realizaron con el medio DMEM/F12 suplementado. Sin embargo, al observar que la tasa de crecimiento no era óptima, tuvimos que buscar un medio de cultivo alternativo. El único estudio que utilizaba un medio de cultivo diferente al DMEM/F12 era el realizado en retina de rata por Engelhardt y colaboradores (2004). El medio Neurobasal A es un medio neurogénico que permite cultivos a largo plazo de neuronas postnatales, y se recomienda suplementarlo con B27 o N<sub>2</sub>. El medio Neurobasal A suplementado fue el que nos proporcionó los mejores resultados.

En nuestros ensayos las primeras neuroesferas se forman durante la primera semana de cultivo. Dichas neuroesferas son de pequeño tamaño y en algunos casos irregulares, por lo que en esta etapa del cultivo no podemos afirmar que todas las neuroesferas que observamos se hayan formado únicamente por división y no por adhesión celular. En los sucesivos cambios de medio realizamos disgregaciones mecánicas con una pipeta para disociar las neuroesferas y favorecer así la proliferación celular. A la tercera semana de cultivo y tras cuatro cambios de medio, el número de neuroesferas aumenta considerablemente y no observamos formas irregulares o signos de adhesión celular. En el caso de que las neuroesferas se formasen por adhesión y no por división celular al realizar varias disgregaciones observaríamos una disminución de las neuroesferas, y no un aumento.

En el pez cuchillo (Hinsch y Zupanc, 2006) se ha descrito una evolución similar en cultivos de células progenitoras neurales. Las primeras neuroesferas se observan a los 3-4 días de realizar el cultivo y la tasa de crecimiento se mantiene estable hasta la tercera semana. Sin embargo, a partir de los 21 días la tasa de proliferación comienza a disminuir. Esto no ocurrió en nuestro estudio, ya que hemos conseguido mantener los cultivos celulares estables hasta un mes y medio.

Tras obtener un cultivo estable de progenitores de bastón, el siguiente paso era caracterizarlos. Para ello, las células se siembran sobre cubreobjetos tratados con sustancias adherentes para forzar que las células se adhieran al sustrato y se diferencien. Los progenitores disgregados no se adherían al sustrato independientemente del tratamiento que utilizásemos. Debido a que durante los primeros días de cultivos observamos células diferenciadas pegadas a la placa, pensamos que la no adherencia de los progenitores se debe a que los productos utilizados no funcionan correctamente a 20°C. Tanto la poliornitina, como la laminina y la fibronectina necesitan incubaciones a 37°C durante un par de horas, por lo que la temperatura debe de ser un factor limitante. La no adherencia de nuestras células a un sustrato nos ha impedido caracterizarlas mediante inmunocitoquímica e hibridación *in situ*. En futuros experimentos tendremos que probar nuevas sustancias adherentes e intentar modificar los protocolos para adaptarlos a 20°C.

En el presente trabajo hemos puesto a punto un protocolo de cultivo primario de células progenitoras de bastón en teleósteos. Esta técnica nos dará las herramientas necesarias para estudiar y caracterizar los progenitores retinianos *in vitro*. Aunque se conoce que bajo determinados estímulos los progenitores de bastón son capaces de generar todos los tipos celulares de la retina *in vivo*, no se sabe cuáles son los mecanismos que regulan este

proceso. El cultivo de los progenitores nos permitirá estudiar qué factores están implicados en la diferenciación de los distintos tipos celulares retinianos y qué moléculas regulan este proceso. Con estos datos se podrán realizar terapias celulares más precisas que permitan reponer las células perdidas.

Los teleósteos se han convertido en un modelo animal muy utilizado en todos los campos de la neurociencia, desde el análisis del desarrollo embrionario hasta el estudio de enfermedades neurodegenerativas. Aunque la mayoría de las técnicas experimentales empleadas en mamíferos se pueden extrapolar a teleósteos, no ocurre lo mismo con los cultivos celulares, ya que apenas existen datos sobre el comportamiento *in vitro* de los progenitores neurales. Por tanto, el protocolo de cultivo primario diseñado en el presente trabajo permitirá realizar ensayos *in vitro* ampliando los estudios *in vivo* y *ex vivo* existentes.

# Conclusiones

---



## *Conclusiones*

---

De acuerdo con los objetivos planteados en este Trabajo de Tesis Doctoral y como consecuencia de los resultados obtenidos y su discusión, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. Las inyecciones intraperitoneales de BrdU nos permiten marcar e identificar las poblaciones de retinoblastos de la retina madura del carpín. Hemos descrito células inmaduras en la retina periférica y tres tipos de progenitores pertenecientes al linaje de bastón: células madre de la CNI (las más difíciles de localizar debido a su baja tasa proliferativa), progenitores en migración y precursores de bastón.

2. La presencia de diferentes marcadores neurales en los progenitores de bastón está relacionada con su localización en las diferentes capas de la retina y con el proceso de migración que realizan. Mientras que los progenitores en migración son positivos para casi la totalidad de los marcadores estudiados (Islet1, Prox1, NeuroD, Notch1, CD133 y Nestina), las células madre de la CNI (Pax6 y Notch1) y los precursores de bastón (NeuroD y Notch1) presentan una expresión mucho más restringida.

3. Los procesos de diferenciación y migración de los progenitores retinianos están íntimamente relacionados. Los cambios en el patrón de expresión de los marcadores neurales durante la migración de las células progenitoras provocan una paulatina determinación de dichas células hacia bastones. El marcaje observado en los progenitores en migración parece indicar que éstas células conservan la capacidad de generar otros tipos celulares, mientras que cuando se transforman en precursores de bastón estarían determinados para diferenciarse exclusivamente a bastones.

4. El protocolo de cultivo primario diseñado en el presente trabajo permite aislar y cultivar los progenitores de bastón de la retina adulta de carpín. La obtención de un cultivo primario de neuroesferas nos permite obtener, tras una serie de cambios de medio, un cultivo puro y estable de progenitores de bastón.

# Bibliografía

---

- Acharya, H.R., Dooley, C.M., Thoreson, W.B., y Ahmad, I. (1997).** cDNA cloning and expression analysis of NeuroD mRNA in human retina. *Biochem Biophys Res Commun* 233, 459-463.
- Ahmad, I., Zaqouras, P., y Artavanis-Tsakonas, S. (1995).** Involvement of Notch-1 in mammalian retinal neurogenesis: association of Notch-1 activity with both immature and terminally differentiated cells. *Mech Dev* 53, 73-85.
- Ahmad, I., Acharya, H.R., Rogers, J.A., Shibata, A., Smithgall, T.E., y Dooley, C.M. (1998).** The role of NeuroD as a differentiation factor in the mammalian retina. *J Mol Neurosci* 11, 165-178.
- Ahmad, I., Dooley, C.M., Thoreson, W.B., Rogers, J.A., y Afiat, S. (1999).** In vitro analysis of a mammalian retinal progenitor that gives rise to neurons and glia. *Brain Res* 831, 1-10.
- Ahmad, I., Tang, L., y Pham, H. (2000).** Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 517-521.
- Ahmad, I., Das, A.V., James, J., Bhattacharya, S., y Zhao, X. (2004).** Neural stem cells in the mammalian eye: types and regulation. *Semin Cell Dev Biol* 15, 53-62.
- Akagi, T., Haruta, M., Akita, J., Nishida, A., Honda, Y., y Takahashi, M. (2003).** Different characteristics of rat retinal progenitor cells from different culture periods. *Neurosci Lett* 341, 213-216.
- Aleksyrova, M.A., Podgornyi, O.V., Poltavtseva, R.A., Panova, I.G., y Sukhikh, G.T. (2006).** Structure and cell composition of spheres cultured from human fetal retina. *Bull Exp Biol Med* 142, 152-159.
- Altmann, C.R., Chow, R.L., Lang, R.A., y Hemmati-Brivanlou, A. (1997).** Lens induction by Pax6 in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 185, 119-123.
- Alvarez-Buylla, A. y Garcia-Verdugo, J.M. (2002).** Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22, 629-634.
- Anchan, R.M., Reh, T.A., Angello, J., Balliet, A., y Walker, M. (1991).** EGF and TGF- $\alpha$  stimulate retinal neuroepithelial cell proliferation *in vitro*. *Neuron* 6, 923-936.
- Angenieux, B., Schorderet, D.F., y Arsenijevic, Y. (2006).** Epidermal growth factor is a neuronal differentiation factor for retinal stem cells *in vitro*. *Stem Cells* 24, 696-706.
- Arai, S., Thomas, B.B., Seiler, M.J., Aramant, R.B., Qiu, G., Mui, C., de Juan, E., y Sadda, S.R. (2004).** Restoration of visual responses following transplantation of intact retinal sheets in rd mice. *Exp Eye Res* 79, 331-341.
- Aramant, R.B. y Seiler, M.J. (2002).** Retinal transplantation--advantages of intact fetal sheets. *Prog Retin Eye Res* 21, 57-73.
- Austin, C.P., Feldman, D.E., Ida, J.A., Jr., y Cepko, C.L. (1995).** Vertebrate retinal ganglion cells are selected from competent progenitors by the action of Notch. *Development* 121, 3637-3650.
- Banin, E., Obolensky, A., Idelson, M., Hemo, I., Reinhardt, E., Pikarsky, E., Ben Hur, T., y Reubinoff, B. (2006).** Retinal incorporation and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 24, 246-257.
- Bao, Z.Z. y Cepko, C.L. (1997).** The expression and function of Notch pathway genes in the developing rat eye. *J Neurosci* 17, 1425-1434.
- Barthel, L.K. y Raymond, P.A. (1993).** Subcellular localization of alpha-tubulin and opsin mRNA in the goldfish retina using digoxigenin-labeled cRNA probes detected by alkaline phosphatase and HRP histochemistry. *J Neurosci Methods* 50, 145-152.
- Bäumer, N., Marquardt, T., Stoykova, A., Spieler, D., Treichel, D., Ashery-Padan, R., y Gruss, P. (2003).** Retinal pigmented epithelium determination requires the redundant activities of Pax2 and Pax6. *Development* 130, 2903-2915.
- Baylor, D.A., Fuortes, M.G., y O'Bryan, P.M. (1971).** Receptive fields of cones in the retina of the turtle. *J Physiol* 214, 265-294.
- Beaudet, L., Novales, F., I, y Hawryshyn, C.W. (1997).** Cone photoreceptor topography in the retina of sexually mature Pacific salmonid fishes. *J Comp Neurol* 383, 49-59.
- Belecky-Adams, T., Tomarev, S., Li, H.S., Ploder, L., McInnes, R.R., Sundin, O., y Adler, R. (1997).** Pax6, Prox 1, and Chx10 homeobox gene expression correlates with phenotypic fate of retinal precursor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1293-1303.
- Bernardos, R.L., Barthel, L.K., Meyers, J.R., y**

- Raymond, P.A. (2007).** Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Müller glia that function as retinal stem cells. *J Neurosci* 27, 7028-7040.
- Berson, D.M. (2003).** Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci* 26, 314-320.
- Bertrand, N., Castro, D.S. y Guillemot, F. (2002).** Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nature Reviews. Neuroscience* 3:517-530.
- Bessant, D.A., Ali, R.R., y Bhattacharya, S.S. (2001).** Molecular genetics and prospects for therapy of the inherited retinal dystrophies. *Curr Opin Genet Dev* 11, 307-316.
- Bhat, S.P., Rayner, S.A., Huang, C.M., y Ariyasu, R.G. (1999).** Quantitative estimation of RNA transcripts suggests persistence of Pax6 expression in the postembryonic chick retina. *Dev Neurosci* 21, 140-146.
- Bick, M.D. y Davidson, R.L. (1974).** Total substitution of bromodeoxyuridine for thymidine in the DNA of a bromodeoxyuridine-dependent cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 2082-2086.
- Blumcke, I., Schewe, J.C., Normann, S., Brustle, O., Schramm, J., Elger, C.E., y Wiestler, O.D. (2001).** Increase of nestin-immunoreactive neural precursor cells in the dentate gyrus of pediatric patients with early-onset temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 11, 311-321.
- Boije, H., Edqvist, P.H., y Hallböök, F. (2008).** Temporal and spatial expression of transcription factors FoxN4, Ptf1a, Prox1, Isl1 and Lim1 mRNA in the developing chick retina. *Gene Expr. Patterns*. 8, 117-123.
- Boycott, B.B. y Wässle, H. (1974).** The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. *J Physiol* 240, 397-419.
- Boycott, B.B. y Wässle, H. (1991).** Morphological Classification of Bipolar Cells of the Primate Retina. *Eur. J Neurosci* 3, 1069-1088.
- Branchek, T. y Bremiller, R. (1984).** The development of photoreceptors in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. I. Structure. *J Comp Neurol* 224, 107-115.
- Bray, S. (1998).** Notch signalling in *Drosophila*: three ways to use a pathway. *Semin Cell Dev Biol* 9, 591-597.
- Bringmann, A., Skatchkov, S.N., Pannicke, T., Biedermann, B., Wolburg, H., Orky, R.K., y Reichenbach, A. (2000).** Müller glial cells in anuran retina. *Microsc. Res Tech.* 50, 384-393.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A., y Israel, A. (2000).** A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* 5, 207-216.
- Burglin, T.R. (1994).** A *Caenorhabditis elegans* prospero homologue defines a novel domain. *Trends Biochem Sci* 19, 70-71.
- Burkhardt, D.A. (1977).** Responses and receptive-field organization of cones in perch retinas. *J Neurophysiol.* 40, 53-62.
- Burnside, B., Wang, E., Pagh-Roehl, K., y Rey, H. (1993).** Retinomotor movements in isolated teleost retinal cone inner-outer segment preparations (CIS-COS): effects of light, dark and dopamine. *Exp Eye Res* 57, 709-722.
- Burrill, J.D. y Easter, S.S., Jr. (1994).** Development of the retinofugal projections in the embryonic and larval zebrafish (*Brachydanio rerio*). *J Comp Neurol* 346, 583-600.
- Callaerts, P., Halder, G., y Gehring, W.J. (1997).** Pax6 in development and evolution. *Annu. Rev Neurosci* 20, 483-532.
- Calof, A.L., Bonnin, A., Crocker, C., Kawauchi, S., Murray, R.C., Shou, J., y Wu, H.H. (2002).** Progenitor cells of the olfactory receptor neuron lineage. *Microsc. Res Tech.* 58, 176-188.
- Candal, E., Anadon, R., DeGrip, W.J., and Rodriguez-Moldes, I. (2005).** Patterns of cell proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of the brown trout. *Brain Res Dev Brain Res* 154, 101-119.
- Canola, K., Angenieux, B., Tekaya, M., Quiambao, A., Naash, M.I., Munier, F.L., Schorderet, D.F., y Arsenijevic, Y. (2007).** Retinal stem cells transplanted into models of late stages of retinitis pigmentosa preferentially adopt a glial or a retinal ganglion cell fate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 446-454.
- Carter, D.A., Dick, A.D., y Mayer, E.J. (2009).** CD133+ adult human retinal cells remain undifferentiated in Leukaemia Inhibitory Factor (LIF). *BMC Ophthalmol* 9, 1.

- Cepko, C.L., Austin, C.P., Yang, X., Alexiades, M., y Ezzeddine, D. (1996). Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 589-595.
- Chacko, D.M., Das, A.V., Zhao, X., James, J., Bhattacharya, S., y Ahmad, I. (2003). Transplantation of ocular stem cells: the role of injury in incorporation and differentiation of grafted cells in the retina. *Vision Res* 43, 937-946.
- Chae, J.H., Stein, G.H., y Lee, J.E. (2004). NeuroD: the predicted and the surprising. *Mol Cells* 18, 271-288.
- Chambers, C.B., Peng, Y., Nguyen, H., Gaiano, N., Fishell, G., y Nye, J.S. (2001). Spatiotemporal selectivity of response to Notch1 signals in mammalian forebrain precursors. *Development* 128, 689-702.
- Chen, L., Yang, P., y Kijlstra, A. (2002). Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul. Immunol Inflamm.* 10, 27-39.
- Chitnis, A., Henrique, D., Lewis, J., Ish-Horowicz, D., y Kintner, C. (1995). Primary neurogenesis in *Xenopus* embryos regulated by a homologue of the *Drosophila* neurogenic gene Delta. *Nature* 375, 761-766.
- Cho, S.S., Lucas, J.J., y Hyndman, A.G. (1999). Transferrin binding protein is expressed by oligodendrocytes in the avian retina. *Brain Res* 816, 229-233.
- Chow, R.L., Altmann, C.R., Lang, R.A., y Hemmati-Brivanlou, A. (1999). Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development* 126, 4213-4222.
- Chu, Y., Hughes, S., y Chan-Ling, T. (2001). Differentiation and migration of astrocyte precursor cells and astrocytes in human fetal retina: relevance to optic nerve coloboma. *FASEB J* 15, 2013-2015.
- Cid, E., Velasco, A., Ciudad, J., Orfao, A., Aijon, J., y Lara, J.M. (2002). Quantitative evaluation of the distribution of proliferating cells in the adult retina in three cyprinid species. *Cell Tissue Res* 308, 47-59.
- Clarke, S.R., Shetty, A.K., Bradley, J.L., y Turner, D.A. (1994). Reactive astrocytes express the embryonic intermediate neurofilament nestin. *Neuroreport* 5, 1885-1888.
- Coles, B.L., Angenieux, B., Inoue, T., Rio-Tsonis, K., Spence, J.R., McInnes, R.R., Arsenijevic, Y., y van der, K.D. (2004). Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15772-15777.
- Cook, T. (2003). Cell diversity in the retina: more than meets the eye. *Bioessays* 25, 921-925.
- Corbeil, D., Roper, K., Weigmann, A., y Huttner, W.B. (1998). AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family? *Blood* 91, 2625-2626.
- Corbeil, D., Roper, K., Hannah, M.J., Hellwig, A., y Huttner, W.B. (1999). Selective localization of the polytopic membrane protein prominin in microvilli of epithelial cells - a combination of apical sorting and retention in plasma membrane protrusions. *J Cell Sci* 112 ( Pt 7), 1023-1033.
- Corbeil, D., Roper, K., Hellwig, A., Taviani, M., Miraglia, S., Watt, S.M., Simmons, P.J., Peault, B., Buck, D.W., y Huttner, W.B. (2000). The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem* 275, 5512-5520.
- Corbeil, D., Roper, K., Fargeas, C.A., Joester, A., y Huttner, W.B. (2001). Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. *Traffic* 2, 82-91.
- Das, A.V., James, J., Rahnenfuhrer, J., Thoreson, W.B., Bhattacharya, S., Zhao, X., y Ahmad, I. (2005). Retinal properties and potential of the adult mammalian ciliary epithelium stem cells. *Vision Res* 45, 1653-1666.
- Dawid, I.B., Toyama, R., y Taira, M. (1995). LIM domain proteins. *C R. Acad Sci III* 318, 295-306.
- de Melo, J., Qiu, X., Du, G., Cristante, L., y Eisenstat, D.D. (2003). Dlx1, Dlx2, Pax6, Brn3b, and Chx10 homeobox gene expression defines the retinal ganglion and inner nuclear layers of the developing and adult mouse retina. *J Comp Neurol* 461, 187-204.
- Delacour, A., Nepote, V., Trumpp, A., y Herrera, P.L. (2004). Nestin expression in pancreatic exocrine cell lineages. *Mech Dev* 121, 3-14.
- Djamgoz, M.B., Spadavecchia, L., Usai, C., y Valleria, S. (1990). Variability of light-evoked response pattern and morphological

- p>characterization of amacrine cells in goldfish retina.
- J Comp Neurol*
- 301, 171-190.
- Djamgoz, M.B., Krasowska, M., Martinoli, O., Sericano, M., Vallergera, S., y Grzywna, Z.J. (2001).** Structure-function correlation in transient amacrine cells of goldfish retina: basic and multifractal analyses of dendritic trees in distinct synaptic layers. *J Neurosci Res* 66, 1208-1216.
- Dorrell, M.I., Aguilar, E., y Friedlyer, M. (2002).** Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 3500-3510.
- Dorsky, R.I., Rapaport, D.H., y Harris, W.A. (1995).** Xotch inhibits cell differentiation in the *Xenopus* retina. *Neuron* 14, 487-496.
- Douglas, R.H. y Wagner, H.J. (1982).** Endogenous patterns of photomechanical movements in teleosts and their relation to activity rhythms. *Cell Tissue Res* 226:133-144.
- Dowling, J.E. y Ehinger, B. (1978).** The interplexiform cell system. I. Synapses of the dopaminergic neurons of the goldfish retina. *Proc R. Soc. Lond B Biol Sci* 201, 7-26.
- Dyer, M.A., Livesey, F.J., Cepko, C.L., y Oliver, G. (2003).** Prox1 function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina. *Nat Genet* 34, 53-58.
- Easter, S.S. (1983).** Postnatal neurogenesis and changing connections. *Trends Neurosci* 6:53-56.
- Easter, S.S., Jr., Bratton, B., y Scherer, S.S. (1984).** Growth-related order of the retinal fiber layer in goldfish. *J Neurosci* 4, 2173-2190.
- Easter, S.S., Jr. (1992).** Retinal growth in foveated teleosts: nasotemporal asymmetry keeps the fovea in temporal retina. *J Neurosci* 12, 2381-2392.
- Edqvist, P.H. y Hallböök, F. (2004).** Newborn horizontal cells migrate bi-directionally across the neuroepithelium during retinal development. *Development* 131, 1343-1351.
- Edqvist, P.H., Myers, S.M., y Hallböök, F. (2006).** Early identification of retinal subtypes in the developing, pre-laminated chick retina using the transcription factors Prox1, Lim1, Ap2alpha, Pax6, Isl1, Isl2, Lim3 and Chx10. *Eur. J Histochem* 50, 147-154.
- Ekström, P., Johnsson, C.M., y Ohlin, L.M. (2001).** Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones. *J Comp Neurol* 436, 92-110.
- Elshatory, Y., Deng, M., Xie, X., y Gan, L. (2007).** Expression of the LIM-homeodomain protein Isl1 in the developing and mature mouse retina. *J Comp Neurol* 503, 182-197.
- Engelhardt, M., Wachs, F.P., Couillard-Despres, S., y Aigner, L. (2004).** The neurogenic competence of progenitors from the postnatal rat retina *in vitro*. *Exp Eye Res* 78, 1025-1036.
- Ericson, J., Thor, S., Edlund, T., Jessell, T.M., y Yamada, T. (1992).** Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene Islet1. *Science* 256, 1555-1560.
- Faillace, M.P., Julian, D., y Korenbrot, J.I. (2002).** Mitotic activation of proliferative cells in the inner nuclear layer of the mature fish retina: regulatory signals and molecular markers. *J Comp Neurol* 451, 127-141.
- Famiglietti, E.V., Jr. y Kolb, H. (1976).** Structural basis for ON-and OFF-center responses in retinal ganglion cells. *Science* 194, 193-195.
- Farah, M.H., Olson, J.M., Sucic, H.B., Hume, R.I., Tapscott, S.J., y Turner, D.L. (2000).** Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development* 127, 693-702.
- Fargeas, C.A., Florek, M., Huttner, W.B., y Corbeil, D. (2003).** Characterization of prominin -2, a new member of the prominin family of pentaspan membrane glycoproteins. *J Biol Chem* 278, 8586-8596.
- Fausett, B.V. y Goldman, D. (2006).** A role for alpha1 tubulin-expressing Müller glia in regeneration of the injured zebrafish retina. *J Neurosci* 26, 6303-6313.
- Fedoroff, S., Zhai, R., y Novak, J.P. (1997).** Microglia and astroglia have a common progenitor cell. *J Neurosci Res* 50, 477-486.
- Fimbel, S.M., Montgomery, J.E., Burket, C.T., y Hyde, D.R. (2007).** Regeneration of inner retinal neurons after intravitreal injection of ouabain in zebrafish. *J Neurosci* 27, 1712-1724.
- Fischer, A.J. y Reh, T.A. (2000).** Identification of a

- p proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens.
- Dev Biol*
- 220, 197-210.
- Fischer, A.J., McGuire, C.R., Dierks, B.D., and Reh, T.A. (2002).** Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Muller glia of the chicken retina. *J Neurosci* 22, 9387-9398.
- Fischer, A.J. y Reh, T.A. (2003).** Potential of Müller glia to become neurogenic retinal progenitor cells. *Glia* 43, 70-76.
- Fischer, A.J. (2005).** Neural regeneration in the chick retina. *Prog Retin Eye Res* 24, 161-182.
- Fischer, A.J., Stanke, J.J., Aloisio, G., Hoy, H., y Stell, W.K. (2007).** Heterogeneity of horizontal cells in the chicken retina. *J Comp Neurol* 500, 1154-1171.
- Florek, M., Haase, M., Marzesco, A.M., Freund, D., Ehninger, G., Huttner, W.B., y Corbeil, D. (2005).** Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer. *Cell Tissue Res* 319, 15-26.
- Font, E., Desfilis, E., Perez-Canellas, M.M., y Garcia-Verdugo, J.M. (2001).** Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult reptilian brain. *Brain Behav Evol* 58, 276-295.
- Foster, R.G., Provencio, I., Hudson, D., Fiske, S., De Grip, W., y Menaker, M. (1991).** Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd). *J Comp Physiol [A]* 169, 39-50.
- Fuortes, M.G., Schwartz, E.A., y Simon, E.J. (1973).** Colour-dependence of cone responses in the turtle retina. *J Physiol* 234, 199-216.
- Furukawa, T., Mukherjee, S., Bao, Z.Z., Morrow, E.M., y Cepko, C.L. (2000).** rax, Hes1, and notch1 promote the formation of Müller glia by postnatal retinal progenitor cells. *Neuron* 26, 383-394.
- Gaiano, N. y Fishell, G. (2002).** The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annu. Rev Neurosci* 25, 471-490.
- Galli-Resta, L., Resta, G., Tan, S.S., y Reese, B.E. (1997).** Mosaics of islet-1-expressing amacrine cells assembled by short-range cellular interactions. *J Neurosci* 17, 7831-7838.
- Gamm, D.M., Nelson, A.D., y Svendsen, C.N. (2005).** Human retinal progenitor cells grown as neurospheres demonstrate time-dependent changes in neuronal and glial cell fate potential. *Ann N Y Acad Sci* 1049, 107-117.
- Gariano, R.F. (2003).** Cellular mechanisms in retinal vascular development. *Prog Retin Eye Res* 22, 295-306.
- Genoud, S., Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Radtke, F., Aguet, M., Scherer, S.S., Suter, U., Nave, K.A., y Mantei, N. (2002).** Notch1 control of oligodendrocyte differentiation in the spinal cord. *J Cell Biol* 158, 709-718.
- Giordano, F., De Marzo, A., Vetrini, F., y Marigo, V. (2007).** Fibroblast growth factor and epidermal growth factor differently affect differentiation of murine retinal stem cells *in vitro*. *Mol Vis* 13, 1842-1850.
- Glaser, T., Jepeal, L., Edwards, J.G., Young, S.R., Favor, J., y Maas, R.L. (1994).** Pax6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nat Genet* 7, 463-471.
- Glasgow, E. y Tomarev, S.I. (1998).** Restricted expression of the homeobox gene *prox 1* in developing zebrafish. *Mech Dev* 76, 175-178.
- Goldman, R.D., Chou, Y.H., Prahlad, V., y Yoon, M. (1999).** Intermediate filaments: dynamic processes regulating their assembly, motility, and interactions with other cytoskeletal systems. *FASEB J* 13 Suppl 2, S261-S265.
- Goldsmith, M.H. (1980).** Light-inducible Cytochrome Reduction in Membrane Preparations from Corn Coleoptiles: I. Stabilization and spectral characterization of the reaction. *Plant Physiol* 66, 1067-1073.
- Götz, M. and Barde, Y.A. (2005).** Radial glial cells defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons. *Neuron* 46, 369-372.
- Grun, G. (1975).** Structural basis of the functional development of the retina in the cichlid *Tilapia leucosticta* (teleostei). *J Embryol. Exp Morphol.* 33, 243-257.
- Gu, P., Harwood, L.J., Zhang, X., Wylie, M., Curry, W.J., y Cogliati, T. (2007).** Isolation of retinal progenitor and stem cells from the porcine eye. *Mol Vis* 13, 1045-1057.

- Halder, G., Callaerts, P., y Gehring, W.J. (1995).** Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* 267, 1788-1792.
- Harris, W.A. y Perron, M. (1998).** Molecular recapitulation: the growth of the vertebrate retina. *Int J Dev Biol* 42, 299-304.
- Hatakeyama, J. y Kageyama, R. (2004).** Retinal cell fate determination and bHLH factors. *Semin Cell Dev Biol* 15, 83-89.
- Haverkamp, S., Haeseleer, F., y Hendrickson, A. (2003).** A comparison of immunocytochemical markers to identify bipolar cell types in human and monkey retina. *Vis Neurosci* 20, 589-600.
- Hayes, B.P. y Holden, A.L. (1983).** The distribution of displaced ganglion cells in the retina of the pigeon. *Exp Brain Res* 49, 181-188.
- Hayes, S., Nelson, B.R., Buckingham, B., y Reh, T.A. (2007).** Notch signaling regulates regeneration in the avian retina. *Dev Biol* 312, 300-311.
- Heins, N., Malatesta, P., Cecconi, F., Nakafuku, M., Tucker, K.L., Hack, M.A., Chapouton, P., Barde, Y.A., y Götz, M. (2002).** Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat Neurosci* 5, 308-315.
- Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J., y Ish-Horowicz, D. (1995).** Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* 375, 787-790.
- Henrique, D., Hirsinger, E., Adam, J., Le, R., I. Pourquie, O., Ish-Horowicz, D., y Lewis, J. (1997).** Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina. *Curr Biol* 7, 661-670.
- Hicks, D. y Courtois, Y. (1992).** Fibroblast growth factor stimulates photoreceptor differentiation in vitro. *J Neurosci* 12, 2022-2033.
- Hidalgo, A. y Griffiths, R. (2004).** Coupling glial numbers and axonal patterns. *Cell Cycle* 3, 1118-1120.
- Hinsch, K. y Zupanc, G.K. (2006).** Isolation, cultivation, and differentiation of neural stem cells from adult fish brain. *J Neurosci Methods* 158, 75-88.
- Hinsch, K. y Zupanc, G.K. (2007).** Generation and long-term persistence of new neurons in the adult zebrafish brain: a quantitative analysis. *Neuroscience* 146, 679-696.
- Hirsch, N. y Harris, W.A. (1997).** *Xenopus* Pax6 and retinal development. *J Neurobiol* 32, 45-61.
- Hitchcock, P.F. y Easter, S.S., Jr. (1986).** Retinal ganglion cells in goldfish: a qualitative classification into four morphological types, and a quantitative study of the development of one of them. *J Neurosci* 6, 1037-1050.
- Hitchcock, P.F., Macdonald, R.E., VyeRyt, J.T., y Wilson, S.W. (1996).** Antibodies against Pax6 immunostain amacrine and ganglion cells and neuronal progenitors, but not rod precursors, in the normal and regenerating retina of the goldfish. *J Neurobiol* 29, 399-413.
- Hitchcock, P. y Kakuk-Atkins, L. (2004).** The basic helix-loop-helix transcription factor neuroD is expressed in the rod lineage of the teleost retina. *J Comp Neurol* 477, 108-117.
- Hitchcock, P., Ochocinska, M., Sieh, A., y Otteson, D. (2004).** Persistent and injury-induced neurogenesis in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res* 23, 183-194.
- Hobert, O. y Westphal, H. (2000).** Functions of LIM-homeobox genes. *Trends Genet* 16, 75-83.
- Hockfield, S. y McKay, R.D. (1985).** Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* 5, 3310-3328.
- Hogan, B., Horsburgh, G., Cohen, J., Hetherington, C.M., Fischer, G. y Lyon, M.F. (1986).** Small eyes (Sey): a homozygous lethal mutation on chromosome 2 which affected the differentiation of both lens and nasal placodes in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 97:95-110.
- Hojo, M., Ohtsuka, T., Hashimoto, N., Gradwohl, G., Guillemot, F., y Kageyama, R. (2000).** Glial cell fate specification modulated by the bHLH gene Hes5 in mouse retina. *Development* 127, 2515-2522.
- Hollyfield, J.G. (1968).** Differential addition of cells to the retina in *Rana pipiens* tadpoles. *Dev Biol* 18, 163-179.
- Hu, J., Tang, S.B., Ma, J., Wu, J.L., y Shen, H.X. (2007).** Experimental studies on the existence and distribution characteristics of neural stem cells in adult human ciliary body and retina. *Zhonghua*



- Yan. Ke. Za Zhi.* 43, 222-227.
- Hughes, A. y Wieniawa-Narkiewicz, E. (1980).** A newly identified population of presumptive microneurons in the cat retinal ganglion cell layer. *Nature* 284, 468-470.
- Hughes, A., Saszik, S., Bilotta, J., Demarco, P.J., Jr., y Patterson, W.F. (1998).** Cone contributions to the photopic spectral sensitivity of the zebrafish ERG. *Vis Neurosci* 15, 1029-1037.
- Inoue, T., Hojo, M., Bessho, Y., Tano, Y., Lee, J.E., y Kageyama, R. (2002).** Math3 and NeuroD regulate amacrine cell fate specification in the retina. *Development* 129, 831-842.
- Jadhav, A.P., Cho, S.H., y Cepko, C.L. (2006a).** Notch activity permits retinal cells to progress through multiple progenitor states and acquire a stem cell property. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18998-19003.
- Jadhav, A.P., Mason, H.A., y Cepko, C.L. (2006b).** Notch 1 inhibits photoreceptor production in the developing mammalian retina. *Development* 133, 913-923.
- Jaszai, J., Fargeas, C.A., Florek, M., Huttner, W.B., y Corbeil, D. (2007).** Focus on molecules: prominin-1 (CD133). *Exp Eye Res* 85, 585-586.
- Jeffery, W., Strickler, A., Guiney, S., Heyser, D., y Tomarev, S. (2000).** Prox 1 in eye degeneration and sensory organ compensation during development and evolution of the cavefish *Astyanax*. *Dev Genes Evol* 210, 223-230.
- Johns, P.R. y Easter, S.S., Jr. (1977).** Growth of the adult goldfish eye. II. Increase in retinal cell number. *J Comp Neurol* 176, 331-341.
- Johns, P.R. y Fernald, R.D. (1981).** Genesis of rods in teleost fish retina. *Nature* 293, 141-142.
- Johns, P.R. (1982).** Formation of photoreceptors in larval and adult goldfish. *J Neurosci* 2, 178-198.
- Julian, D., Ennis, K., y Korenbrot, J.I. (1998).** Birth and fate of proliferative cells in the inner nuclear layer of the mature fish retina. *J Comp Neurol* 394, 271-282.
- Jun, S. y Desplan, C. (1996).** Cooperative interactions between paired domain and homeodomain. *Development* 122, 2639-2650.
- Kachinsky, A.M., Dominov, J.A., y Miller, J.B. (1995).** Intermediate filaments in cardiac myogenesis: nestin in the developing mouse heart. *J Histochem Cytochem* 43, 843-847.
- Kalloniatis, M. y Marc, R.E. (1990).** Interplexiform cells of the goldfish retina. *J Comp Neurol* 297, 340-358.
- Kaneko, Y., Matsumoto, G., y Hanyu, Y. (1999).** Pax6 expression during retinal regeneration in the adult newt. *Dev Growth Differ* 41, 723-729.
- Karlsson, O., Thor, S., Norberg, T., Ohlsson, H., y Edlund, T. (1990).** Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* 344, 879-882.
- Klassen, H.J., Ng, T.F., Kurimoto, Y., Kirov, I., Shatos, M., Coffey, P., y Young, M.J. (2004).** Multipotent retinal progenitors express developmental markers, differentiate into retinal neurons, and preserve light-mediated behavior. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 4167-4173.
- Klassen, H., Kiilgaard, J.F., Zahir, T., Ziaieian, B., Kirov, I., Scherfig, E., Warfvinge, K., y Young, M.J. (2007).** Progenitor cells from the porcine neural retina express photoreceptor markers after transplantation to the subretinal space of allogeneic recipients. *Stem Cells* 25, 1222-1230.
- Klassen, H., Warfvinge, K., Schwartz, P.H., Kiilgaard, J.F., Shamie, N., Jiang, C., Samuel, M., Scherfig, E., Prather, R.S., y Young, M.J. (2008).** Isolation of progenitor cells from GFP-transgenic pigs and transplantation to the retina of allogeneic recipients. *Cloning Stem Cells* 10, 391-402.
- Kawakami, A., Kimura-Kawakami, M., Nomura, T., y Fujisawa, H. (1997).** Distributions of Pax6 and Pax7 proteins suggest their involvement in both early and late phases of chick brain development. *Mech Dev* 66, 119-130.
- Kock, J.H. (1982).** Neuronal addition and retinal expansion during growth of the crucian carp eye. *J Comp Neurol* 209, 264-274.
- Kolb, H. y Nelson, R. (1981).** Amacrine cells of the cat retina. *Vision Res* 21, 1625-1633.
- Kolb, H., Linberg, K.A., y Fisher, S.K. (1992).** Neurons of the human retina: a Golgi study. *J Comp Neurol* 318, 147-187.
- Kolb, H., Fernández, E. y Nelson, R. (2000).** Web vision. h t t p : / /

[www.webvision.med.utah.edu](http://www.webvision.med.utah.edu).

- Kolbinger, W., Wagner, D., y Wagner, H.J. (1996).** Control of rod retinomotor movements in teleost retinæ: the role of dopamine in mediating light-dependent and circadian signals. *Cell Tissue Res* 285, 445-451.
- Kopatz, K. y Distler, C. (2000).** Astrocyte invasion and vasculogenesis in the developing ferret retina. *J Neurocytol* 29, 157-172.
- Kozmik, Z. (2005).** Pax genes in eye development and evolution. *Curr Opin Genet Dev* 15, 430-438.
- Krauss, S., Johansen, T., Korzh, V., y Fjose, A. (1991).** Expression of the zebrafish paired box gene pax[zf-b] during early neurogenesis. *Development* 113, 1193-1206.
- Kubota, R., Hokoc, J.N., Moshiri, A., McGuire, C., y Reh, T.A. (2002).** A comparative study of neurogenesis in the retinal ciliary marginal zone of homeothermic vertebrates. *Brain Res Dev Brain Res* 134, 31-41.
- Kustermann, S., Schmid, S., Biehlmaier, O., and Kohler, K. (2008).** Survival, excitability, and transfection of retinal neurons in an organotypic culture of mature zebrafish retina. *Cell Tissue Res* 332, 195-209.
- Lasansky, A. (1981).** Synaptic action mediating cone responses to annular illumination in the retina of the larval tiger salamyer. *J Physiol* 310, 205-214.
- Lavado, A. y Oliver, G. (2007).** Prox1 expression patterns in the developing and adult murine brain. *Dev Dyn* 236, 518-524.
- Lee, J.E., Hollenberg, S.M., Snider, L., Turner, D.L., Lipnick, N., y Weintraub, H. (1995).** Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268, 836-844.
- Lee, J.E. (1997).** NeuroD and neurogenesis. *Dev Neurosci* 19, 27-32.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B., y McKay, R.D. (1990).** CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585-595.
- Leventhal, A.G., Rodieck, R.W., y Dreher, B. (1981).** Retinal ganglion cell classes in the Old World monkey: morphology and central projections. *Science* 213, 1139-1142.
- Lillien, L. y Cepko, C. (1992).** Control of proliferation in the retina: temporal changes in responsiveness to FGF and TGF alpha. *Development* 115, 253-266.
- Lillo, C., Velasco, A., Jimeno, D., Lara, J.M., y Aijon, J. (1998).** Ultrastructural organization of the optic nerve of the tench (Cyprinidae, Teleostei). *J Neurocytol* 27, 593-604.
- Lillo, C., Velasco, A., Jimeno, D., Cid, E., Aijon, J., y Lara, J.M. (2001).** Non-neuronal cells involved in the degeneration and regeneration of the fish retina. *J Neurocytol* 30, 475-491.
- Lillo, C., Velasco, A., Jimeno, D., Cid, E., Lara, J.M., y Aijon, J. (2002).** The glial design of a teleost optic nerve head supporting continuous growth. *J Histochem Cytochem* 50, 1289-1302.
- Ling, T.L. y Stone, J. (1988).** The development of astrocytes in the cat retina: evidence of migration from the optic nerve. *Brain Res Dev Brain Res* 44, 73-85.
- Liu, W., Wang, J.H., y Xiang, M. (2000).** Specific expression of the LIM/homeodomain protein Lim-1 in horizontal cells during retinogenesis. *Dev Dyn* 217, 320-325.
- Liu, H., Etter, P., Hayes, S., Jones, I., Nelson, B., Hartman, B., Forrest, D., y Reh, T.A. (2008).** NeuroD1 regulates expression of thyroid hormone receptor 2 and cone opsins in the developing mouse retina. *J Neurosci* 28, 749-756.
- Lyall, A.H. (1956).** The growth of the trout retina. *The Quarterly Journal of Microscopical Science* 98:101-110.
- Mack, A.F. y Fernald, R.D. (1997).** Cell movement and cell cycle dynamics in the retina of the adult teleost *Haplochromis burtoni*. *J Comp Neurol* 388, 435-443.
- Mack, A.F., Papanikolaou, D., y Lillo, C. (2003).** Investigation of the migration path for new rod photoreceptors in the adult cichlid fish retina. *Exp Neurol* 184, 90-96.
- MacLaren, R.E., Pearson, R.A., MacNeil, A., Douglas, R.H., Salt, T.E., Akimoto, M., Swaroop, A., Sowden, J.C., y Ali, R.R. (2006).** Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature* 444, 203-207.
- MacNeil, A., Pearson, R.A., MacLaren, R.E., Smith, A.J., Sowden, J.C., y Ali, R.R. (2007).**

- Comparative analysis of progenitor cells isolated from the iris, pars plana, and ciliary body of the adult porcine eye. *Stem Cells* 25, 2430-2438.
- Macy, A. y Easter, S.S., Jr. (1981).** Growth-related changes in the size of receptive field centers of retinal ganglion cells in goldfish. *Vision Res* 21, 1497-1504.
- Mahler, J. y Driever, W. (2007).** Expression of the zebrafish intermediate neurofilament Nestin in the developing nervous system and in neural proliferation zones at postembryonic stages. *BMC Dev Biol* 7, 89.
- Makar'ev, E.O., Zinov'eva, R.D., y Mitashov, V.I. (2002).** Expression of regulatory homeobox genes during retina regeneration in adult newts. *Izv. Akad. Nauk Ser. Biol* 663-667.
- Marc, R.E. y Liu, W.L. (1984).** Horizontal cell synapses onto glycine-accumulating interplexiform cells. *Nature* 312, 266-269.
- Marc, R.E. (1998).** The structure of vertebrate retinas. En: The retinal basis of vision (eds. Toyoda, J. et al.) Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- Marc, R.E. y Cameron, D. (2001).** A molecular phenotype atlas of the zebrafish retina. *J Neurocytol* 30, 593-654.
- Mariani, A.P. (1984).** Bipolar cells in monkey retina selective for the cones likely to be blue-sensitive. *Nature* 308, 184-186.
- Mariani, A.P. (1985).** Multiaxonal horizontal cells in the retina of the tree shrew, *Tupaia glis*. *J Comp Neurol* 233, 553-563.
- Markitantova, Y.V., Makariev, E.O., Pavlova, G.V., Zinov'eva, R.D., y Mitashov, V.I. (2003).** Location of the Prox1 gene expression during newt lens and retina regeneration. *Dokl. Biol Sci* 391, 361-364.
- Markitantova, I., Makar'ev, E.O., Smirnova, I., Zinov'eva, R.D., y Mitashov, V.I. (2004).** Analysis of the expression pattern of regulatory genes Pax6, Prox1, and Six3 during regeneration of eye structures in the newt. *Izv. Akad. Nauk Ser. Biol* 522-531.
- Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Yrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F., y Gruss, P. (2001).** Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* 105, 43-55.
- Marquardt, T. (2003).** Transcriptional control of neuronal diversification in the retina. *Prog Retin Eye Res* 22, 567-577.
- Marshak, D.W. y Dowling, J.E. (1987).** Synapses of cone horizontal cell axons in goldfish retina. *J Comp Neurol* 256, 430-443.
- Martin, P., Carriere, C., Dozier, C., Quatannens, B., Mirabel, M.A., Vyenbunder, B., Stehelin, D., y Saule, S. (1992).** Characterization of a paired box- and homeobox-containing quail gene (Pax-QNR) expressed in the neuroretina. *Oncogene* 7, 1721-1728.
- Matsui, K., Hosoi, N., y Tachibana, M. (1999).** Active role of glutamate uptake in the synaptic transmission from retinal nonspiking neurons. *J Neurosci* 19, 6755-6766.
- Maw, M.A., Corbeil, D., Koch, J., Hellwig, A., Wilson-Wheeler, J.C., Bridges, R.J., Kumaramanickavel, G., John, S., Nancarrow, D., Roper, K., Weigmann, A., Huttner, W.B., y Denton, M.J. (2000).** A frameshift mutation in prominin (mouse)-like 1 causes human retinal degeneration. *Hum Mol Genet* 9, 27-34.
- Mayer, E.J., Hughes, E.H., Carter, D.A., y Dick, A.D. (2003).** Nestin positive cells in adult human retina and in epiretinal membranes. *Br. J Ophthalmol* 87, 1154-1158.
- Meyer, R.L. (1978).** Evidence from thymidine labeling for continuing growth of retina and tectum in juvenile goldfish. *Exp Neurol* 59, 99-111.
- Moore, S. y Thanos, S. (1996).** The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration. *Prog Neurobiol* 48, 441-460.
- Morris, A.C., Scholz, T., y Fadool, J.M. (2008).** Rod progenitor cells in the mature zebrafish retina. *Adv. Exp Med Biol* 613, 361-368.
- Morrow, E.M., Furukawa, T., Lee, J.E., y Cepko, C.L. (1999).** NeuroD regulates multiple functions in the developing neural retina in rodent. *Development* 126, 23-36.
- Moshiri, A., Close, J., y Reh, T.A. (2004).** Retinal stem cells and regeneration. *Int J Dev Biol* 48, 1003-1014.
- Müller, H. (1952).** Bau und wachstum der netzhaut des Guppy (*Lebistes reticulatus*). *Zoologische*

- Jahrbücher Abteilung für Allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere* 63:275-324.
- Nakazawa, T., Tachi, S., Aikawa, E., y Ihnuma, M. (1993).** Formation of the myelinated nerve fiber layer in the chicken retina. *Glia* 8, 114-121.
- Navascues, J., Calvente, R., Marin-Teva, J.L., y Cuadros, M.A. (2000).** Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system. *An. Acad Bras. Cienc.* 72, 91-102.
- Negishi, K., Teranishi, T., y Kato, S. (1985).** Retinal growth in carp of the same age: density and number of dopamine neurons. *Brain Res* 350, 125-131.
- Newman, E. y Reichenbach, A. (1996).** The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci* 19, 307-312.
- Nickerson, P.E., Emsley, J.G., Myers, T., y Clarke, D.B. (2007).** Proliferation and expression of progenitor and mature retinal phenotypes in the adult mammalian ciliary body after retinal ganglion cell injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 5266-5275.
- Nishina, S., Kohsaka, S., Yamaguchi, Y., Hya, H., Kawakami, A., Fujisawa, H., y Azuma, N. (1999).** Pax6 expression in the developing human eye. *Br. J Ophthalmol* 83, 723-727.
- Nornes, S., Clarkson, M., Mikkola, I., Pedersen, M., Bardsley, A., Martinez, J.P., Krauss, S., y Johansen, T. (1998).** Zebrafish contains two pax6 genes involved in eye development. *Mech Dev* 77, 185-196.
- O'Bryan, P.M. (1973).** Properties of the depolarizing synaptic potential evoked by peripheral illumination in cones of the turtle retina. *J Physiol* 235, 207-223.
- Ochocinska, M.J. y Hitchcock, P.F. (2007).** Dynamic expression of the basic helix-loop-helix transcription factor neuroD in the rod and cone photoreceptor lineages in the retina of the embryonic and larval zebrafish. *J Comp Neurol* 501, 1-12.
- Ochocinska, M.J. y Hitchcock, P.F. (2009).** NeuroD regulates proliferation of photoreceptor progenitors in the retina of the zebrafish. *Mech Dev* 126, 128-141.
- Ohnuma, S., Hopper, S., Wang, K.C., Philpott, A., y Harris, W.A. (2002).** Co-ordinating retinal histogenesis: early cell cycle exit enhances early cell fate determination in the *Xenopus* retina. *Development* 129, 2435-2446.
- Oliver, G., Sosa-Pineda, B., Geisendorf, S., Spana, E.P., Doe, C.Q., y Gruss, P. (1993).** Prox 1, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development. *Mech Dev* 44, 3-16.
- Olson, A.J., Picones, A., Julian, D., y Korenbrot, J.I. (1999).** A developmental time line in a retinal slice from rainbow trout. *J Neurosci Methods* 93, 91-100.
- Ooto, S., Akagi, T., Kageyama, R., Akita, J., Myai, M., Honda, Y., y Takahashi, M. (2004).** Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13654-13659.
- Otteson, D.C., D'Costa, A.R., y Hitchcock, P.F. (2001).** Putative stem cells and the lineage of rod photoreceptors in the mature retina of the goldfish. *Dev Biol* 232, 62-76.
- Otteson, D.C. y Hitchcock, P.F. (2003).** Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury-induced regeneration. *Vision Res* 43, 927-936.
- Perron, M., Kanekar, S., Vetter, M.L., y Harris, W.A. (1998).** The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the *Xenopus* eye. *Dev Biol* 199, 185-200.
- Perron, M. y Harris, W.A. (2000).** Determination of vertebrate retinal progenitor cell fate by the Notch pathway and basic helix-loop-helix transcription factors. *Cell Mol Life Sci* 57, 215-223.
- Pfaff, S.L., Mendelsohn, M., Stewart, C.L., Edlund, T., y Jessell, T.M. (1996).** Requirement for LIM homeobox gene Isl1 in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* 84, 309-320.
- Piper, D.R., Mujtaba, T., Keyoung, H., Roy, N.S., Goldman, S.A., Rao, M.S., y Lucero, M.T. (2001).** Identification and characterization of neuronal precursors and their progeny from human fetal tissue. *J Neurosci Res* 66, 356-368.
- Prigent, C. y Dimitrov, S. (2003).** Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci* 116, 3677-3685.

- Püschel, A.W., Gruss, P., y Westerfield, M. (1992).** Sequence and expression pattern of Pax6 are highly conserved between zebrafish and mice. *Development* 114, 643-651.
- Qiu, G., Seiler, M.J., Arai, S., Aramant, R.B., y Sadda, S.R. (2004).** Alternative culture conditions for isolation and expansion of retinal progenitor cells. *Curr Eye Res* 28, 327-336.
- Qiu, G., Seiler, M.J., Thomas, B.B., Wu, K., Radosevich, M., y Sadda, S.R. (2007).** Revisiting nestin expression in retinal progenitor cells *in vitro* and after transplantation *in vivo*. *Exp Eye Res* 84, 1047-1059.
- Radtke, N.D., Aramant, R.B., Seiler, M.J., Petry, H.M., y Pidwell, D. (2004).** Vision change after sheet transplant of fetal retina with retinal pigment epithelium to a patient with retinitis pigmentosa. *Arch. Ophthalmol* 122, 1159-1165.
- Ramón y Cajal, S. (1889).** Sistema visual, órgano receptor de la excitación visual o retina. En: "Textura del sistema nervioso del hombre y los vertebrados". Madrid: Imp. Nicolás Moya.
- Ramón y Cajal, S. (1892).** La rétine des vertébrés. *Cellule* 9: 121-225.
- Rauch, U., Klotz, M., Maas-Omlor, S., Wink, E., Hansgen, A., Hagl, C., Holly-Cunz, S., y Schafer, K.H. (2006).** Expression of intermediate filament proteins and neuronal markers in the human fetal gut. *J Histochem Cytochem* 54, 39-46.
- Raymond, P.A. (1985).** Cyto differentiation of photoreceptors in larval goldfish: delayed maturation of rods. *J Comp Neurol* 236, 90-105.
- Raymond, P.A. (1986).** Movement of retinal terminals in goldfish optic tectum predicted by analysis of neuronal proliferation. *J Neurosci* 6, 2479-2488.
- Raymond, P.A. y Rivlin, P.K. (1987).** Germinal cells in the goldfish retina that produce rod photoreceptors. *Dev Biol* 122, 120-138.
- Raymond, P.A. (1991).** Retinal regeneration in teleost fish. *Ciba Found. Symp.* 160, 171-186.
- Raymond, P.A. y Hitchcock, P.F. (2000).** How the neural retina regenerates. *Results Probl. Cell Differ* 31, 197-218.
- Raymond, P.A., Barthel, L.K., Bernardos, R.L., y Perkowski, J.J. (2006).** Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Dev Biol* 6, 36.
- Reichenbach, A. y Wohlrab, F. (1986).** Morphometric parameters of Müller (glial) cells dependent on their topographic localization in the nonmyelinated part of the rabbit retina. A consideration of functional aspects of radial glia. *J Neurocytol* 15, 451-459.
- Reichenbach, A. y Robinson, S.R. (1995).** Ependymoglia and ependymoglia-like cells. En: *Neuroglia* (eds. Kettenmann, H. y Ransom, B.R.) University Press, Oxford. 58- 84.
- Rio-Tsonis, K., Washabaugh, C.H., y Tsonis, P.A. (1995).** Expression of Pax6 during urodele eye development and lens regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5092-5096.
- Rio-Tsonis, K., Tomarev, S.I., y Tsonis, P.A. (1999).** Regulation of Prox1 during lens regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 2039-2045.
- Robinson, J., Schmitt, E.A., Harosi, F.I., Reece, R.J., y Dowling, J.E. (1993).** Zebrafish ultraviolet visual pigment: absorption spectrum, sequence, and localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6009-6012.
- Rosser, A.E., Tyers, P., ter Borg, M., Dunnett, S.B., y Svendsen, C.N. (1997).** Co-expression of MAP-2 and GFAP in cells developing from rat EGF responsive precursor cells. *Brain Res Dev Brain Res* 98, 291-295.
- Roztocil, T., Matter-Sadzinski, L., Alliod, C., Ballivet, M., y Matter, J.M. (1997).** NeuroM, a neural helix-loop-helix transcription factor, defines a new transition stage in neurogenesis. *Development* 124, 3263-3272.
- Rusoff, A.C. y Easter, S.S., Jr. (1980).** Order in the optic nerve of goldfish. *Science* 208, 311-312.
- Sagdullaev, B.T., Aramant, R.B., Seiler, M.J., Woch, G., y McCall, M.A. (2003).** Retinal transplantation-induced recovery of retinotectal visual function in a rodent model of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 1686-1695.
- Sakagami, K., Ishii, A., Shimada, N., y Yasuda, K. (2003).** RaxL regulates chick ganglion cell development. *Mech Dev* 120, 881-895.

- Sandy, J.M. y Blaxter, J.H.S. (1980).** A study of retinal development in larvae herring and sole. *JMBA* 60:59-71.
- Santamaria, J.A., Mari-Beffa, M., Santos-Ruiz, L., y Becerra, J. (1996).** Incorporation of bromodeoxyuridine in regenerating fin tissue of the goldfish *Carassius auratus*. *J Exp Zool.* 275, 300-307.
- Scheer, N., Groth, A., Hans, S., y Campos-Ortega, J.A. (2001).** An instructive function for Notch in promoting gliogenesis in the zebrafish retina. *Development* 128, 1099-1107.
- Schmitt, E. y Kunz, Y.W. (1989).** Retinal morphogenesis in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Brain Behav Evol* 34, 48-64.
- Schnitzer, J. (1988).** Immunocytochemical studies on the development of astrocytes, Müller (glial) cells, and oligodendrocytes in the rabbit retina. *Brain Res Dev Brain Res* 44, 59-72.
- Scholes, J.H. (1979).** Nerve fibre topography in the retinal projection to the tectum. *Nature* 278, 620-624.
- Schraermeyer, U., Thumann, G., Luther, T., Kociok, N., Armhold, S., Kruttwig, K., Yressen, C., Addicks, K., y Bartz-Schmidt, K.U. (2001).** Subretinally transplanted embryonic stem cells rescue photoreceptor cells from degeneration in the RCS rats. *Cell Transplant.* 10, 673-680.
- Shkumatava, A. y Neumann, C.J. (2005).** Shh directs cell-cycle exit by activating p57Kip2 in the zebrafish retina. *EMBO Rep.* 6, 563-569.
- Shmelkov, S.V., Jun, L., St Clair, R., McGarrigle, D., Derderian, C.A., Usenko, J.K., Costa, C., Zhang, F., Guo, X., y Rafii, S. (2004).** Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133. *Blood* 103, 2055-2061.
- Shmelkov, S.V., St Clair, R., Lyden, D., y Rafii, S. (2005).** AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 715-719.
- Silva, A.O., Ercole, C.E., y McLoon, S.C. (2003).** Regulation of ganglion cell production by Notch signaling during retinal development. *J Neurobiol* 54, 511-524.
- Silverman, M.S. y Hughes, S.E. (1989).** Transplantation of photoreceptors to light-damaged retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30, 1684-1690.
- Stell, W.K., Walker, S.E., Chohan, K.S., y Ball, A.K. (1984).** The goldfish nervus terminalis: a luteinizing hormone-releasing hormone and molluscan cardioexcitatory peptide immunoreactive olfactoretinal pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 940-944.
- Stenkamp, D.L., Barthel, L.K., y Raymond, P.A. (1997).** Spatiotemporal coordination of rod and cone photoreceptor differentiation in goldfish retina. *J Comp Neurol* 382, 272-284.
- Stoll, G. y Jyer, S. (1999).** The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol* 58, 233-247.
- Straznicky, K. y Gaze, R.M. (1971).** The growth of the retina in *Xenopus laevis*: an autoradiographic study. *J Embryol. Exp Morphol.* 26, 67-79.
- Strickler, A.G., Yamamoto, Y., y Jeffery, W.R. (2001).** Early and late changes in Pax6 expression accompany eye degeneration during cavefish development. *Dev Genes Evol* 211, 138-144.
- Stuermer, C.A. (1988).** Retinotopic organization of the developing retinotectal projection in the zebrafish embryo. *J Neurosci* 8, 4513-4530.
- Svetichin, G. y Macnichol, E.F., Jr. (1959).** Retinal mechanisms for chromatic and achromatic vision. *Ann N Y Acad Sci* 74, 385-404.
- Takeda, M., Takamiya, A., Jiao, J.W., Cho, K.S., Trevino, S.G., Matsuda, T., y Chen, D.F. (2008).** alpha-Aminoadipate induces progenitor cell properties of Müller glia in adult mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 1142-1150.
- Taupin, P. y Gage, F.H. (2002).** Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res* 69, 745-749.
- Teranishi, T., Negishi, K., y Kato, S. (1983).** Dopamine modulates S-potential amplitude and dye-coupling between external horizontal cells in carp retina. *Nature* 301, 243-246.
- Thor, S., Ericson, J., Brannstrom, T., y Edlund, T. (1991).** The homeodomain LIM protein Isl-1 is expressed in subsets of neurons and endocrine cells in the adult rat. *Neuron* 7, 881-889.
- Tomarev, S.I., Sundin, O., Banerjee-Basu, S., Duncan, M.K., Yang, J.M., y Piatigorsky, J.**

- (1996). Chicken homeobox gene Prox 1 related to *Drosophila prospero* is expressed in the developing lens and retina. *Dev Dyn* 206, 354-367.
- Tomarev, S.I., Zinovieva, R.D., Chang, B., y Hawes, N.L. (1998). Characterization of the mouse Prox1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 248, 684-689.
- Tomita, K., Nakanishi, S., Guillemot, F., y Kageyama, R. (1996). Mash1 promotes neuronal differentiation in the retina. *Genes Cells* 1, 765-774.
- Tomizawa, K., Kunieda, J., y Nakayasu, H. (2001). *Ex vivo* culture of isolated zebrafish whole brain. *J Neurosci Methods* 107, 31-38.
- Tropepe, V., Coles, B.L., Chiasson, B.J., Horsford, D.J., Elia, A.J., McInnes, R.R., y van der, K.D. (2000). Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 287, 2032-2036.
- Tsai, H.H. y Miller, R.H. (2002). Glial cell migration directed by axon guidance cues. *Trends Neurosci* 25, 173-175.
- Turner, D.L. y Cepko, C.L. (1987). A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 328, 131-136.
- Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H., y Weissman, I.L. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14720-14725.
- Uchiyama, H. (1990). Immunohistochemical subpopulations of retinopetal neurons in the nucleus olfactoretinalis in a teleost, the whitespotted greenling (*Hexagrammos stelleri*). *J Comp Neurol* 293, 54-62.
- Umino, Y. y Saito, T. (2002). Spatial and temporal patterns of distribution of the gap junctional protein connexin43 during retinal regeneration of adult newt. *J Comp Neurol* 454, 255-262.
- Van Haesendonck, E., Marc, R.E., y Missotten, L. (1993). New aspects of dopaminergic interplexiform cell organization in the goldfish retina. *J Comp Neurol* 333, 503-518.
- Vecino, E., Velasco, A., Caminos, E., y Aijon, J. (1997). Distribution of S100 immunoreactivity in the retina and optic nerve head of the teleost *Tinca tinca* L. *Microsc. Res Tech.* 36, 17-25.
- Vetter, M.L. y Brown, N.L. (2001). The role of basic helix-loop-helix genes in vertebrate retinogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 12, 491-498.
- Vihtelic, T.S., Yamamoto, Y., Sweeney, M.T., Jeffery, W.R., y Hyde, D.R. (2001). Arrested differentiation and epithelial cell degeneration in zebrafish lens mutants. *Dev Dyn* 222, 625-636.
- Vossmerbaeumer, U., Kuehl, S., Bieback, K., Kluter, H., y Jonas, J.B. (2008). Cultivation and differentiation characteristics of human limbal progenitor cells. *Tissue Cell* 40, 83-88.
- Wagner, H.J. y Wagner, E. (1988). Amacrine cells in the retina of a teleost fish, the roach (*Rutilus rutilus*): a Golgi study on differentiation and layering. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol Sci* 321, 263-324.
- Wagner, H.J. (1990). Retinal structure of fishes. En: The Visual System of Fish (eds. Douglas, R.H. y Djamgoz, M.B.A.) Chapman y Hall, Londres. 109-157.
- Wagner, H.J. y Wulle, I. (1992). Contacts of dopaminergic interplexiform cells in the outer retina of the blue acara. *Vis Neurosci* 9, 325-333.
- Walsh, J.G., Barreda, D.R., y Belosevic, M. (2007). Cloning and expression analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) prominin. *Fish. Shellfish. Immunol* 22, 308-317.
- Walther, C. y Gruss, P. (1991). Pax6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113, 1435-1449.
- Wan, J., Zheng, H., Chen, Z.L., Xiao, H.L., Shen, Z.J., y Zhou, G.M. (2008). Preferential regeneration of photoreceptor from Müller glia after retinal degeneration in adult rat. *Vision Res* 48, 223-234.
- Wang, S., Sdrulla, A.D., diSibio, G., Bush, G., Nofziger, D., Hicks, C., Weinmaster, G., y Barres, B.A. (1998). Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron* 21, 63-75.
- Watanabe, T. y Raff, M.C. (1988). Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature* 332, 834-837.
- Weigmann, A., Corbeil, D., Hellwig, A., y Huttner, W.B. (1997). Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-

- pithelial cells.
- Proc Natl Acad Sci U S A*
- 94, 12425-12430.
- Weissman, I.L. (2000).** Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287, 1442-1446.
- Werblin, F.S. y Dowling, J.E. (1969).** Organization of the retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording. *J Neurophysiol.* 32, 339-355.
- Wetts, R. y Fraser, S.E. (1988).** Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina. *Science* 239, 1142-1145.
- Williams, R.W. (2000).** Mapping genes that modulate mouse brain development: a quantitative genetic approach. In: A.F. Goffinet and P. Rakic, Editors, *Mouse brain development*, Springer Verlag, New York, pp. 21-49.
- Wilson, R., Ainscough, R., Yerson, K., Baynes, C., Berks, M., Bonfield, J., Burton, J., Connell, M., Copsey, T., y Cooper, J. (1994).** 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature* 368, 32-38.
- Wolburg, H. (1980).** Myelinated axons of ganglion cells in the retinae of teleosts. *Cell Tissue Res* 210, 517-520.
- Wolburg, H. y Kurz-Isler, G. (1985).** Dynamics of gap junctions between horizontal cells in the goldfish retina. *Exp Brain Res* 60, 397-401.
- Won, M.H., Kang, T.C., y Cho, S.S. (2000).** Glial cells in the bird retina: immunochemical detection. *Microsc. Res Tech.* 50, 151-160.
- Wu, S.M. (1991).** Input-output relations of the feedback synapse between horizontal cells and cones in the tiger salamyer retina. *J Neurophysiol.* 65, 1197-1206.
- Wu, S.M., Gao, F., y Maple, B.R. (2000).** Functional architecture of synapses in the inner retina: segregation of visual signals by stratification of bipolar cell axon terminals. *J Neurosci* 20, 4462-4470.
- Wu, D.M., Schneiderman, T., Burgett, J., Gokhale, P., Barthel, L., y Raymond, P.A. (2001).** Cones regenerate from retinal stem cells sequestered in the inner nuclear layer of adult goldfish retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 2115-2124.
- Xu, H., Sta Iglesia, D.D., Kielczewski, J.L., Valenta, D.F., Pease, M.E., Zack, D.J., y Quigley, H.A. (2007a).** Characteristics of progenitor cells derived from adult ciliary body in mouse, rat, and human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 1674-1682.
- Xu, S., Sunderly, M.E., Coles, B.L., Kam, A., Holowacz, T., Ashery-Padan, R., Marquardt, T., McInnes, R.R., y van der, K.D. (2007b).** The proliferation and expansion of retinal stem cells require functional Pax6. *Dev Biol* 304, 713-721.
- Xue, L.P., Lu, J., Cao, Q., Kaur, C., y Ling, E.A. (2006).** Nestin expression in Müller glial cells in postnatal rat retina and its upregulation following optic nerve transection. *Neuroscience* 143, 117-127.
- Yamaguchi, M., Saito, H., Suzuki, M., y Mori, K. (2000).** Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice. *Neuroreport* 11, 1991-1996.
- Yan, R.T. y Wang, S.Z. (1998).** NeuroD induces photoreceptor cell overproduction *in vivo* and *de novo* generation *in vitro*. *J Neurobiol* 36, 485-496.
- Yang, P., Seiler, M.J., Aramant, R.B., y Whittemore, S.R. (2002a).** *In vitro* isolation and expansion of human retinal progenitor cells. *Exp Neurol* 177, 326-331.
- Yang, P., Seiler, M.J., Aramant, R.B., y Whittemore, S.R. (2002b).** Differential lineage restriction of rat retinal progenitor cells *in vitro* and *in vivo*. *J Neurosci Res* 69, 466-476.
- Yang, J., Nissen, M.H., y Wang, W. (2006).** Isolation, culture and identification of rat retinal progenitor cells *in vitro*. *Zhonghua Yan. Ke. Za Zhi.* 42, 104-110.
- Yang, Z., Chen, Y., Lillo, C., Chien, J., Yu, Z., Michaelides, M., Klein, M., Howes, K.A., Li, Y., Kaminoh, Y., Chen, H., Zhao, C., Chen, Y., Al Sheikh, Y.T., Karan, G., Corbeil, D., Escher, P., Kamaya, S., Li, C., Johnson, S., Frederick, J.M., Zhao, Y., Wang, C., Cameron, D.J., Huttner, W.B., Schorderet, D.F., Munier, F.L., Moore, A.T., Birch, D.G., Baehr, W., Hunt, D.M., Williams, D.S., y Zhang, K. (2008).** Mutant prominin 1 found in patients with macular degeneration disrupts photoreceptor disk morphogenesis in mice. *J Clin. Invest* 118, 2908-2916.



- Yao, J., Sun, X., Wang, Y., y Wang, L. (2006).** Müller glia induce retinal progenitor cells to differentiate into retinal ganglion cells. *Neuroreport* 17, 1263-1267.
- Yaron, O., Farhy, C., Marquardt, T., Applebury, M., y Ashery-Padan, R. (2006).** Notch1 functions to suppress cone-photoreceptor fate specification in the developing mouse retina. *Development* 133, 1367-1378.
- Yin, A.H., Miraglia, S., Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A.G., Olweus, J., Kearney, J., y Buck, D.W. (1997).** AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 5002-5012.
- Young, R.W. y Bok, D. (1969).** Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol* 42, 392-403.
- Young, R.W. (1971).** Shedding of discs from rod outer segments in the rhesus monkey. *J Ultrastruct. Res* 34, 190-203.
- Young, M.J., Ray, J., Whiteley, S.J., Klassen, H., y Gage, F.H. (2000).** Neuronal differentiation and morphological integration of hippocampal progenitor cells transplanted to the retina of immature and mature dystrophic rats. *Mol Cell Neurosci* 16, 197-205.
- Zhang, Y., Porat, R.M., Alon, T., Keshet, E., y Stone, J. (1999).** Tissue oxygen levels control astrocyte movement and differentiation in developing retina. *Brain Res Dev Brain Res* 118, 135-145.
- Zhang, Q., Zulfiqar, F., Xiao, X., Riazuddin, S.A., Ahmad, Z., Caruso, R., MacDonald, I., Sieving, P., Riazuddin, S., y Hejtmancik, J.F. (2007).** Severe retinitis pigmentosa mapped to 4p15 and associated with a novel mutation in the PROM1 gene. *Hum Genet* 122, 293-299.
- Ziman, M.R., Rodger, J., Chen, P., Papadimitriou, J.M., Dunlop, S.A., y Beazley, L.D. (2001).** Pax genes in development and maturation of the vertebrate visual system: implications for optic nerve regeneration. *Histol. Histopathol.* 16, 239-249.
- Zucker, C.L. y Dowling, J.E. (1987).** Centrifugal fibres synapse on dopaminergic interplexiform cells in the teleost retina. *Nature* 330, 166-168.
- Zupanc, G.K. (1999).** Neurogenesis, cell death and regeneration in the adult gymnotiform brain. *J Exp Biol* 202, 1435-1446.